

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra antropologie a genetiky člověka

Diplomová práce

**Identifikace trichologického materiálu metodou High Resolution
Melting vybranými SNPs ve forenzní praxi**

Forensic SNP identification of trichological material by High Resolution
Melting analysis

Bc. Joanne Strobachová

Praha 2013

Vedoucí práce: Mgr. Vlastimil Stenzl

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou diplomovou práci vypracovala samostatně a s použitím literatury uvedené v seznamu literatury.

Bc. Joanne Strobachová

Poděkování

Ráda bych vyjádřila poděkování za ochotu a cenné rady vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Vlastimilu Stenzlovi a za odborné konzultace v biostatistice Mgr. Anastásiyi Zídkové. Ráda bych též poděkovala své sestře, Nikol Janouchové, za korekturu práce.

Dále bych ráda poděkovala své rodině a partnerovi Mgr. Pavlu Kubálkovi za poskytnutí zázemí a všestranné podpory. Mé velké díky patří i mým zaměstnavatelům Bertovi a Ivance van der Maas za toleranci a vstřícný přístup při dokončování této práce.

Tuto práci věnuji památce mého dědy Jana Zikmunda, který mi byl a je velkým vzorem a inspirací.

Obsah:

1.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
2.	ABSTRAKT	9
3.	ÚVOD	11
4.	CÍLE PRÁCE.....	13
5.	TEORETICKÝ ÚVOD	14
5.1.	OCHLUPENÍ LIDSKÉHO TĚLA	14
5.1.1.	STAVBA VLASU.....	15
5.1.2.	FÁZE RŮSTU	16
5.2.	MITOCHONDRIE A MITOCHONDRIÁLNÍ DNA.....	19
5.2.1.	MITOCHONDRIE	20
5.2.2.	STAVBA MTDNA	20
5.2.3.	NOMENKLATURA MUTACÍ MTDNA.....	22
5.2.3.1.	SNP.....	22
5.2.4.	DĚDIČNOST MTDNA.....	23
5.2.5.	MTDNA HAPLOSKUPINY	24
5.3.	ANALÝZA VZORKŮ	27
5.3.1.	SBĚR A UCHOVÁNÍ TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU	27
5.3.2.	IZOLACE DNA	28
5.3.2.1.	IZOLACE DNA Z TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU.....	28
5.3.2.2.	IZOLACE DNA Z BUKÁLNÍCH STĚŘŮ	28
5.3.3.	KVANTIFIKACE DNA.....	29
5.3.4.	AMPLIFIKACE DNA	30
5.3.5.	METODA HRM.....	32

5.3.6.	SEKVENACE DNA	36
6.	MATERIÁL	39
6.1.	SADA TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU V ANAGENNÍ FÁZI	39
6.2.	SADA TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU V TELOGENNÍ FÁZI	41
6.3.	SADA BUKÁLNÍCH STĚRŮ UŽITÁ K OPTIMALIZACI VYBRANÝCH PRIMERŮ	42
7.	METODY	44
7.1.	IZOLACE DNA	44
7.1.1.	IZOLACE DNA Z TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU	44
7.1.2.	IZOLACE DNA Z BUKÁLNÍCH STĚRŮ	45
7.2.	KVANTIFIKACE DNA.....	46
7.2.1.	KVANTIFIKACE NDNA BUKÁLNÍCH STĚRŮ	46
7.3.	AMPLIFIKACE POMOCÍ PCR	47
7.3.1.	VÝBĚR SNP A PŘÍSLUŠNÝCH PRIMERŮ	47
7.3.2.	OBECNÉ SCHÉMA OPTIMALIZACE PRŮBĚHU AMPLIFIKACE	50
7.3.2.1.	OPTIMALIZAČNÍ KROK Č. 1.....	54
7.3.2.2.	OPTIMALIZAČNÍ KROK Č. 2.....	56
7.3.2.3.	OPTIMALIZAČNÍ KROK Č. 3.....	58
7.4.	PROTOKOL SEKVENACE MTDNA.....	58
7.4.1.	AMPLIFIKACE.....	59
7.4.2.	PURIFIKACE AMPLIFIKÁTU I.....	59
7.4.3.	SEKVENAČNÍ REAKCE	60
7.4.4.	PURIFIKACE AMPLIFIKÁTU II	61
7.4.5.	STANOVENÍ SEKVENCE MTDNA.....	62
7.5.	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT	64
8.	VÝSLEDKY	66

8.1.	VÝSLEDKY OPTIMALIZACE AMPLIFIKACE PRIMERU G3010A A NÁSLEDNÉ HRM ANALÝZY	66
8.2.	VÝSLEDKY OPTIMALIZACE AMPLIFIKACE PRIMERU C7028T A NÁSLEDNÉ HRM ANALÝZY	71
8.3.	VÝSLEDKY OPTIMALIZACE AMPLIFIKACE PRIMERU C14766T A NÁSLEDNÉ HRM ANALÝZY	76
8.4.	VÝSLEDKY OPTIMALIZACE AMPLIFIKACE PRIMERŮ A2706G A G12372A A NÁSLEDNÉ HRM ANALÝZY	80
9.	DISKUSE	81
9.1.	ANALYZAČNÍ PROGRAM.....	82
9.2.	ÚSPĚŠNOST IZOLACE MTDNA Z TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU	83
9.3.	DISKUSE K VÝSLEDKŮM ANALÝZY TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU POMOCÍ METODY HRM.....	84
9.3.1.	PRIMER G3010A	84
9.3.2.	PRIMER C7028T.....	84
9.4.	ZAŘAZENÍ ANALYZOVANÝCH VZORKŮ DO HAPLOSKUPIN	86
10.	ZÁVĚR.....	88
11.	POUŽITÁ LITERATURA	89
12.	PŘÍLOHY	95
12.1.	TABULKY	95
12.2.	SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ.....	99
12.3.	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ	101

1. Seznam použitých zkratk

A	adenin
ATP	adenosintrifosfát
bp	páry bází
C	cytosin
CE	kapilární elektroforéza
CRS	Cambridge Reference Sequence
Ct hodnota	bod, kdy došlo k zaznamenání míry fluorescence nad určitou hranici
ddATP	terminační deoxyribonukleotidové báze pro adenin
ddCTP	terminační deoxyribonukleotidové báze pro cytosin
ddGTP	terminační deoxyribonukleotidové báze pro guanin
ddNTP	terminační deoxyribonukleotidové báze
DTT	dithiotreitol
ddTTP	terminační deoxyribonukleotidové báze pro thymin
dH ₂ O	ultračistá denaturovaná voda bez nukleáz
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidové báze
Dol. kvart.	dolní kvartil
ds DNA	dvoušroubovicové DNA
FGF 7	fibroblastový růstový faktor 7
G	guanin
HCN laboratoř	High Copy Number laboratoř
Hor. kvart.	horní kvartil
HpaI	restrikční enzym
HRM	High resolution melting
HV-I	hypervariabilní oblast 1
HV-II	hypervariabilní oblast 2
HV-III	hypervariabilní oblast 3
IGF 1	inzulínu podobný růstový faktor 1
KÚP	Kriminalistický ústav Praha
LCN laboratoř	Low Copy Number laboratoř
MgCl ₂	chlorid hořečnatý
mtDNA	mitochondriální DNA

mtMRCA	„mitochondriální Eva“, v mateřské linii společný předek všech dnes žijících lidí
nDNA	jaderná DNA
PCR	Polymerase Chain Reaction
PK	Proteináza K
rCRS	zrevidovaná CRS
RFU	relativní fluorescenční jednotka (relative fluorescence units)
rpm	počet otáček za minutu
RT-qPCR	kvantitativní Real-time PCR
Sm. Odch.	směrodatná odchylka
SNaPshot	analyzační metoda stanovující variantu nukleotidu SNP
SNP	jednobázový polymorfismus
SNPs	jednobázové polymorfismy
ss DNA	jednošroubovice DNA
STR	krátké tandemové repetice
T	thymin
T _m	teplota tání
T _m ax	teplota tání izolátu axilárního ochlupení,
T _m buk	teplota tání izolátu bukálního stěru
T _m pub	teplota tání izolátu pubického ochlupení
T _m vl	teplota tání izolátu vlasů
T _m 1	teplota tání, první z dvojice měření
T _m 2	teplota tání, druhá z dvojice měření

2. ABSTRAKT

Analýza mitochondriální DNA (mtDNA) vlasů v telogenní fázi hraje důležitou úlohu ve forenzním vyšetřování především z důvodu, že vlasy v této fázi jsou běžným typem biologických stop zanechaných na místě činu. Tento typ stop se vyznačuje častou absencí jaderné DNA (nDNA), a proto je obvykle možná pouze analýza mtDNA. Vzhledem k časové a finanční náročnosti analýzy mtDNA však není možné tuto analýzu standardně provádět u všech relevantních vzorků. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli analyzovat mtDNA izolovanou z trichologického materiálu a identifikovat jej na základě analýzy vybraných jednobázových polymorfismů (SNPs) metodou High Resolution Melting (HRM). Abychom potvrdili robustnost metody HRM u různého typu biologického materiálu jednotlivce, byl analyzován trichologický materiál v anagenní a telogenní fázi.

Z celkového množství pěti vybraných SNP markerů se podařila optimalizace analýzy tří SNP lokalizovaných na mtDNA. U SNP pozice C14766T se potvrdila možnost analýzy trichologického materiálu v anagenní a telogenní fázi. Možnost analýzy SNP C7028T a G3010A je potvrzena pouze u trichologického materiálu v anagenní fázi. Analýzou vybraných SNP markerů pomocí námi optimalizované metody HRM se prokázala nezávislost genotypizační metody na typu biologického materiálu jedince a pro užití těchto SNP byl připraven protokol, který je možný užít ve forenzní praxi.

Klíčová slova: forenzní, genetika, mtDNA, SNP, HRM, trichologický materiál, anagenní fáze, telogenní fáze

ABSTRACT

The analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) from shed hairs has gained high importance in forensic casework since telogen hairs are one of the common type of evidence left at the crime scene. This type of evidence very often lack of nuclear DNA (nDNA), so the analysis of mtDNA is the only possibility. The analysis of trichological material lacking nDNA is not commonly done in the forensic practice because of the high price of the regularly used mtDNA analysis method, as well as the time demandingness.

For these reasons we decided to analyze the mtDNA and identify the trichological material by analysis of chosen single based polymorphism's (SNP) followed by High Resolution

Melting (HRM). In order to verify the robustness of the HRM analysis method on several types of biological material that belongs to one person, we tested trichological material in anagen and telogen.

From total number of 5 selected SNP's, this paper was able to optimize analysis of 3 SNP's. Due to the analysis of SNP C14766T (applicable for the trichological material in anagen and telogen), SNPs C7028T and G3010A (applicable only for the trichological material in anagen). The mtDNA sequences of different biological materials did not show intra-individual differences. Protocol that could be used for the forensic practice with the use of optimized SNP's was prepared based on this research.

Key words: forensic, genetics, mtDNA, SNP, HRM, trichological material, anagen, telogen

3. ÚVOD

Ačkoliv je trichologický materiál, jako jsou vlasy a chlupy, jednou z častých stop na místě činu, genetická analýza tohoto typu stop se ve forenzní praxi rutinně neprovádí. Důvodů je celá řada. Jelikož tento typ trichologického materiálu ve většině případů neobsahuje jadernou DNA (nDNA), například protože je daný trichologický materiál v telogenní fázi (viz dále) anebo je nDNA poškozena, není možná identifikace analýzou krátkých tandemových repetitiv (STR). Je tedy možné zkoumat pouze mitochondriální DNA (mtDNA), k čemuž se nejčastěji užívá sekvenace hypervariabilních oblastí mitochondriálního genomu. Nevýhodou této metody je její finanční a časová náročnost, tudíž se tyto vzorky sekvenací vyšetřují například v případě nízkého počtu stop z místa činu.

Rádi bychom proto nabídli alternativu a možnost analýzy trichologického materiálu, díky které by bylo možné relativně levně, rychle a jednoduše získat informace tohoto typu stop.

Za daných podmínek se jako nejvhodnější metoda k analýze trichologického materiálu jevila metoda High Resolution Melting (HRM), při které se analyzují vybrané SNP markery lokalizované na mtDNA. Metoda HRM se osvědčuje především pro svou relativní nenáročnost po materiální i finanční stránce. Byly vybrány takové SNP markery, které stanovují nejčastější evropské haploskupiny, což mělo zaručit zachycení obou nukleotidových variant vyšetřovaných markerů. Principem metody HRM je stanovení teploty tání amplifikátu, díky které je možné stanovit nukleotidovou variantu analyzované SNP pozice.

Na základě studie Pfeiffer et al, (1999) bylo potvrzeno, že není rozdíl mezi mtDNA různého trichologického materiálu (vlasy, axilárního a pubického ochlupení) a bukalního stěru separovaného z jednoho jedince. Toto tvrzení bychom rádi ověřili pro možnost užití naší testované metody HRM ve forenzní praxi k analýze trichologického materiálu, u kterého není možná analýza nDNA.

V této studii byly testovány dvě sady trichologického materiálu – trichologický materiál v anagenní a telogenní fázi. Sady trichologického materiálu v anagenní fázi obsahovaly vlasy, axilární a pubické ochlupení. Z důvodu vlastní realizace sběru představuje tento

soubor typ trichologického materiálu, který díky arteficiálnímu odstranění kořínku neobsahuje nDNA. Současně bylo možné porovnat izoláty mtDNA většího množství typů biologického materiálu jedince. Soubor trichologického materiálu v telogenní fázi umožnil analyzovat materiál, který nDNA přirozeně neobsahuje.

4. CÍLE PRÁCE

Pro tuto diplomovou práci byly stanoveny následující cíle:

- Vytipování vhodných SNP markerů (lokalizovaných na mtDNA) pro metodu HRM.
- Optimalizace amplifikační reakce / reakce HRM pro každý pár primerů SNP markeru.
- Ověření individuální shody DNA u různých typů trichologického materiálu.

Pro tuto práci byla stanovena nulová hypotéza (H_0):

Teplota tání mtDNA izolované z různého typu biologického materiálu jedinců se neliší. To znamená, že z hlediska genetické analýzy jde o rovnocenný materiál.

- Ověření možnosti zařazení analyzovaných vzorků do haploskupin.
- Optimalizace metody pro možné užití ve forenzní praxi.

5. TEORETICKÝ ÚVOD

Jednou ze základních tezí forenzní vědy je tzv. Locardův princip. Tento princip říká, že každý kontakt za sebou zanechává stopu. Tuto tezi lze v praxi interpretovat tak, že při páchání trestné činnosti dochází k vzájemnému přenosu stop mezi pachatelem, obětí a místem činu.

Nejčastěji analyzovaným typem trichologického materiálu ve forenzní genetice jsou vlasy a pubické ochlupení (Deedrick, 2000). Uvádí se, že až 75% stop zanechaných na místě činu je právě zanechaný trichologický materiál (Petraco, 1985). Toto je dáno především vysokou mírou samovolného uvolňování vlasů v námi sledované telogenní fázi, a to přibližně 50 až 150 vlasů denně (Paulus, Cotsarelis, 1999), dále poměrně snadným rozpoznáním (dáno makroskopickými rozměry) a v neposlední řadě odolností trichologického materiálu vůči degradačním vlivům.

5.1. Ochlupení lidského těla

Vlasy a ochlupení pokrývá celé tělo, krom dlaní rukou a chodidel. Ochlupení z oblastí jako je hlava, hrud', oblast třísel a podpaží či končetin má vlastní charakteristické mikroskopické znaky pro danou oblast růstu. Folikuly, ze kterých vlasy a ochlupení vyrůstá, se liší ve své šířce i tvaru v závislosti na místě růstu, základní struktura je však vždy stejná.

Na lidském těle se rozlišují 3 typy ochlupení (dle Říhové, 1951):

- chmýří - jedná se o jemný a krátký typ vlasů, který je velmi slabě pigmentovaný a nemá dřeň
- terminální vlasy dlouhé - řadí se vlasy kštice, ochlupení podpaží, ochlupení ohanbí a vousy. Pro tento typ vlasů je společná dobrá pigmentace. Dřeň se u vlasů kštice často vyskytuje pouze u báze kořínku, u ostatních typů vlasů se vyvíjí po celé délce
- terminální vlasy krátké - též nazývané vlasy štětinovitými. Do této kategorie patří řasy, obočí, chlupy nozder a zvukovodu.

V době narození pokrývá lidské tělo na 5 milionů vlasových folikul (Paulus, Cotsarelis, 1999) a toto množství se již v průběhu života nemění. Mění se pouze velikost folikul, a to především vlivem androgenů, thyroidních hormonů, glukokortikoidu, prolaktinu či růstových hormonů. Vliv testosteronu a jeho aktivního metabolitu, dihydrotestosteronu, je dobře patrný v období adolescence, kdy pod jeho vlivem dochází ke zvětšení (rozšíření) vlasových folikul v oblasti vousů. Naopak v pozdějším věku ty samé hormony vlivem na folikuly v oblasti hlavy mohou způsobit miniaturizaci vlasových folikul. Toto způsobí, že místo dlouhého terminálního vlasu je produkován vlas typu chmíří, což se opticky jeví jakožto masivní úbytek vlasů (androgenní alopecie) (Obama et al., 1997). Umístění a distribuce folikul je dána geneticky a jejich zárodky jsou zakládány v devátém týdnu těhotenství (Morioka, 2005).

5.1.1.Stavba vlasu

V podélné ose je možné rozlišit vlasový folikul a stvol vlasu (dle Robbins, 1988).

Stavba vlasového folikulu

Vlasový folikul je vlasotvorným orgánem uloženým v epidermální vrstvě kůže, celý útvar je uložen ve vnější vlasové pochvě. Tato vnější kořenová pochva se skládá ze dvou vrstev epiteliálního původu a navazuje na vnější vazivovou pochvu folikulu (Marioka, 2005). Distální část folikulu nepodléhá cyklickým změnám růstu. Proximální konec vlasového folikulu se nazývá vlasová cibulka, tato část folikulu přímo odpovídá za růst vlasu. Ze spodu vlasové cibulky se vnořuje dermální papila obsahující krevní kapiláry, které přivádějí živiny vlasové cibulce. Zároveň se zde nachází androgenní receptory, přes které dochází k hormonálnímu ovlivnění metabolické funkce folikulu (Kaufman, 1996). Nad dermální papilou se nachází prekeratinizační oblast, kde se buňky připravují na keratinizaci. Nejvyšší vrstvou horní části vlasové cibulky je keratogenní oblast, kde dochází k zaplnění buněk keratinem a vlasové buňky umírají (Marioka, 2005). Po průchodu keratogenní oblastí je již vlasový stvol plně keratinizován. Poslední částí vlasového folikulu je folikulární kanál, který začíná od vyústění mazové žlázy a ústí na povrchu pokožky.

Stavba vlasového stvolu

Vlasový stvol se na příčném řezu skládá z dřene, kůry a kutikuly (Říhová, 1951). Jelikož v každém z těchto úseků probíhá keratinizace jiného typu, vlas není mikroskopicky jednotný a tak lze jednotlivé části vlasu rozlišit.

- **Dřeň** (*medulla*). Dřeň je tvořena pouze jednou až dvěma řadami zrohovatělých buněk, které vznikly z keratinocytů lokalizovaných na vrcholu dermální papily. Buňky mají nepravidelný, hvězdovitý tvar a buňky jsou často vyplněny vzduchem. Dřeň se nevyskytuje vždy, například v silnějších vlasech je často vyvinuta pouze v oblasti kořene. Naopak vlasy vousu mají dřeň silně vyvinutou.
- **Kůra** (*cortex*). Kůra vlasového stvolu vzniká z masy buněk pokrývajících boky a částečně vrchol dermální papily. Keratinocyty jsou protáhlé ve směru podélné osy vlasu a nabývají vřetenovitého tvaru. Buňky jsou mezi sebou pevně pospojovány tonofibrily. Charakteristicky se vyskytují váčky s obsahem melaninu, které mohou být roztroušeny či podélně seřazeny. Vzduchové váčky se téměř neobjevují.
- **Kutikula** (*cuticula*). Tato vrstva vzniká z buněk zárodečné masy, která leží na bocích dermální papily zevně od buněk, které tvoří kůru vlasu. Tyto buňky nefagocytují vezikuly s pigmenty, tudíž jsou transparentní. Buňky kutikuly jsou zrohovatělé buňky, které jsou plochými, navzájem se překrývajících šupinami. Okraje šupin mají nepravidelný tvar, které směřují ke špičce vlasu. Kutikula má ochrannou funkci - jádro vlasu chrání před chemickými vlivy, jako je průnik škodlivých látek do vlasu či ochraňuje před mechanickým poškozením.

5.1.2.Fáze růstu

Růst vlasů a ochlupení charakterizují tři fáze růstu, které se cyklicky opakují. Vlasy se v jednotlivých fázích liší jak morfologicky, tak histologicky. Protože folikuly jsou na sobě metabolicky nezávislé, v jeden okamžik se na povrchu těla vyskytují vlasy či ochlupení všech tří fází. Fáze růstu jsou zobrazeny v Obrázku č. 1.

- **Anagenní fáze** je období růstu vlasového stvolu díky vysoké metabolické aktivitě folikulu vlasu. V proliferační oblasti vlasového kořínku a v oblasti dermální papily dochází k vývoji keratinocytů ze zárodečných buněk. K diferenciaci keratinocytů ze zárodečné matrix dochází na základě signálů z dermální papily. Tím jak se buňky mitoticky dělí a posouvají od cibulky k povrchu, formují vlastní vlas i vnitřní kořenové pochvy vlasů (Taylor et al., 2000). Zpočátku jsou tyto buňky nediferencované a mají kulaté jádro. Postupným vytlačováním k vyšším pasážím vlasové cibulky se zvětšuje jejich objem a vertikálně se prodlužují. Buňky, které se při svém vzniku nacházejí nad vrcholem dermální papily, jsou budoucími buňkami dřeně vlasu, směrem k okraji vznikají buňky kůry vlasu a vlasové kutikuly. Buňky nacházející se na okrajích nově vzniklých buněk dají vzniknout vnitřní kořenové pochvě, která se skládá z vrstvy kutikuly vnitřní kořenové pochvy, Huxleyovy a Henleovy vrstvy. Pigmentace vlasových buněk je zajištěna díky aktivitě melanocytů. Melanocyty jsou buňky produkující melanin a nachází se v oblasti dermální papily. Samotný melanin je produkován ve váčcích, které se transportují do vyšších vrstev mezibuněčného prostoru vlasové cibulky, kde dojde k jejich fagocytóze keratinocyty.

Tím, jak se buňky posouvají směrem k ústí vlasového folikulu se dostávají až do kratogenní zóny, kde dochází k jejich keratinizaci a postupné programované smrti. V průběhu keratinizace dochází k aktivaci endonukleázy DNase1L2, která selektivně naštěpuje nDNA (Fischer et al., 2007). Odstranění nDNA se ukazuje jako důležitý krok umožňující zvětšit prostor v buňce a tím i lepší rozmístění keratinu v rámci buňky.

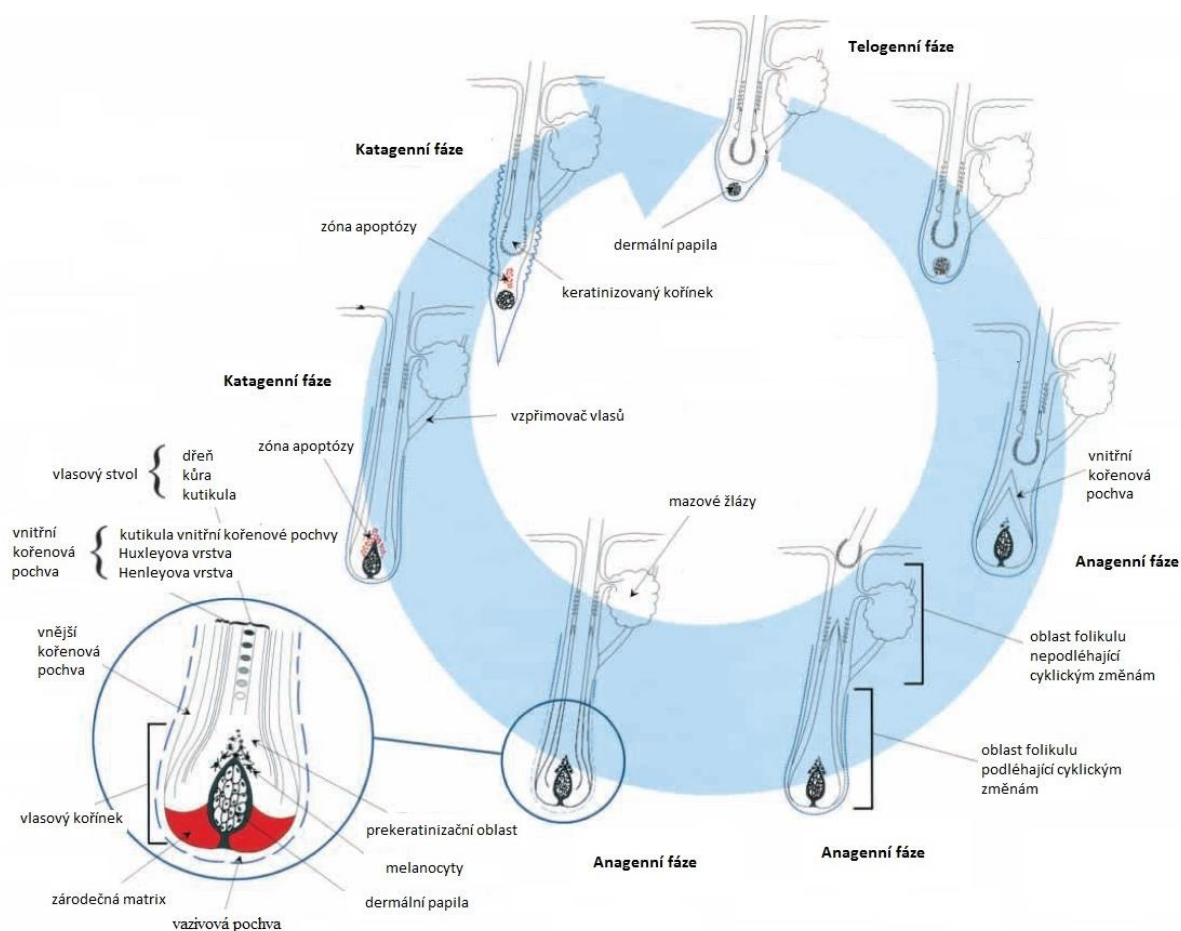
V anagenní fázi růstu mají nejdůležitější signální roli sekretované hormony inzulinu podobný růstový faktor (1 IGF 1) a fibroblastový růstový faktor 7 (FGF 7). Oba tyto růstové hormony jsou produkovány dermální papilou a vážou se na receptory zárodečné matrix (Danilenko et al, 1996). Délka této fáze odráží i možnosti délky vlasového stvolu.

Dle studie Andréasson et al. (2006), která se zaměřila na kvantifikaci nDNA a mtDNA v různých typech forenzních materiálů, se v prvním centimetru vlasu

(včetně kořínku) nachází v průměru 25 800 kopií nDNA a průměrně 3 500 000 kopií mtDNA. Další úsek vlasu (mezi 1-4 cm) obsahuje přibližně 40 200 kopií mtDNA na 1 cm, nDNA se však již v tomto úseku nenachází. Množství nDNA v prvním centimetru vlasu je ve většině případů dostačující k identifikaci osoby na základě analýzy STR lokusů.

- **Katagenní fáze** je fází, kdy dochází k rapidnímu poklesu metabolické aktivity zárodečné matrix. Zároveň je spuštěna apoptóza v oblasti folikulárních keratinocytů v oblasti nad dermální papilou (Slominski et al., 1994). Důsledkem apoptózy dojde k odloučení vnitřní vlasové pochvy, centrální části vlasu i živého kořenu vlasu. Současně dojde ke zmenšení dermální papily. Spolu s oddělením vlasového stvolu dojde k přerušení dodávání živin a čerstvě oddělená část vlasu se stává mrtvým kořenem. Zmenšení dermální papily vede ke zmenšení vnitřního tlaku ve folikulu a dojde ke smrštění vazivové pochvy za současného pohybu vlasového stvolu k ústí vlasového folikulu (Říhová, 1951). Současně se dermální papila přibližuje ke svalu napřimovače vlasu. Tato fáze trvá několik týdnů.
- **Telogenní fáze** je obdobím, kdy je již celý vlas včetně kořínku plně keratinizován. Kořen má zakulacený tvar a konec, který se jeví mírně roztřepen. Dermální papila se pomalu vrací na své původní místo a po dvou až třech měsících přechází folikul do anagenní fáze. K vypadnutí vlasu dochází často mírnými mechanickými vlivy či vytlačení nově rostoucím vlasem. V průběhu dne dochází k uvolnění 50 až 150 vlasů v telogenní fázi (Paulus et al., 1999). Dle publikované studie (Andréasson et al., 2006) se v tomto typu vlasu v prvním centimetru vlasového stvolu (kořínek byl zahrnut) nenachází detekovatelná nDNA. Tento úsek průměrně obsahuje 45 700 kopií mtDNA, v dalším úseku (1-4 cm) se průměrně nachází 20 900 až 26 600 kopií mtDNA na 1 cm.

K obměně vlasů kštice dochází mozaikovitě – přibližně 80 – 90% vlasů se nachází v anagenní fázi, 2% v katagenní fázi a 10 – 18% v telogenní fázi (Dreek, 2002).



Obrázek č. 1. Fáze růstu vlasového folikulu podle Panteleyev et al (2001), upraveno.

5.2. Mitochondrie a mitochondriální DNA

Standardní metodou užívanou k identifikaci jednotlivce ve forenzní genetice je analýza STR repetice lokalizovaných v nDNA. Tuto metodu je však možné spolehlivě užít pouze v případě, že se v izolátu DNA nachází adekvátní množství genetického materiálu dostačující kvality (Moretti et al., 2001). Užití analýzy STR úseků je omezené v případě zhoršené kvality nDNA, jako je její degradace v kratší úseky či úplný rozklad. Vzorky biologických materiálů, jako například staré kosti, zuby či vlasy, často obsahují velmi malé množství nDNA, což může být dáno jejím rozkladem či přirozeně velmi omezeným výskytem. Pro tento typ vzorků je výhodné užít analýzu mtDNA, neboť tato analýza je často úspěšnější než zkoumání nDNA, ačkoliv není možná individuální identifikace a diskriminační síla je nižší než u analýzy STR.

5.2.1. Mitochondrie

Mitochondriální DNA se nachází v semiautonomní organelle zvané mitochondrie. Ta je pravděpodobně prokaryotního původu a nachází se v cytoplazmě všech typů eukaryotních buněk. Mitochondrie je organela oválného tvaru, jejíž obvyklá velikost dosahuje rozměrů v řádu mikrometrů. Hlavní funkcí mitochondrie je vytvářet energii buňce procesem oxidativní fosforylace, kde produktem metabolického procesu je molekula ATP. Mezi další významné metabolické procesy patří například beta-oxidace mastných kyselin.

Počet mitochondrií v buňce není ustálen a jejich počet se liší dle nároku tkáně na přísun energie. V buňce se jich mohou vyskytovat desítky až tisíce. Počet kopií mtDNA v mitochondrii se pohybuje od 1 do 15. Experimentální studií byl stanoven průměrný počet mitochondrií v buňce na 107 kopií, každá mitochondrie má průměrně 4,6 mtDNA. Přibližný počet kopií mtDNA v buňce tedy činí v průměru 500 (Satoh, Kuroiwa, 1991). Na rozdíl od mtDNA má každá buňka pouze dvě kopie nDNA. Toto neplatí pro buňky gamet – zde se vykytuje pouze jedna kopie nDNA.

5.2.2. Stavba mtDNA

Mitochondriální DNA je kruhová dvouřetězcová molekula tvořená antiparalelními řetězci, které jsou vůči sobě komplementární. Základní stavební jednotkou vláken je nukleotid. Základními kameny nukleotidu jsou pětiuhlíkový sacharid 2-deoxy-D-ribosa, vazebný zbytek kyseliny fosforečné a nukleotidová báze. Kostru vlákna, takzvanou cukr-fosfátovou kostru, tvoří sacharid, na jejíž 5' uhlík se váže esterovou vazbou zbytek kyseliny fosforečné. Tento zbytek kyseliny fosforečné tvoří můstek, který se váže přes OH skupinu s předcházející 2-deoxy-D-ribosou (dalším nukleotidem).

Na 1' uhlík sacharózy se váže N-glykosidickou vazbou nukleová báze. Mezi deriváty purinu se řadí adenin (A) a guanin (G), deriváty odvozené od pyrimidinu jsou cytosin (C) a thymin (T). Vlákná mtDNA jsou propojena díky vazebným interakcím bází na základě zákona komplementarity. Dle tohoto zákona se k sobě vždy váže vodíkovými vazbami jedna báze purinu a jedna báze pyrimidinu – adenin a thymin přes dva vodíkové můstky, dále cytosin a guanin přes tři vodíkové můstky.

Molekula mtDNA je dlouhá přibližně 16 569 párů bází a skládá se z takzvaného těžkého a lehkého řetězce. Těžký řetězec, též označovaný jako H-řetězec, je bohatší na puriny (A a především G). Druhý řetězec se označuje jako lehký neboli L-řetězec a dominují v něm nukleotidy skupiny pyrimidinu (T a C). Jelikož má guanin nejvyšší nukleotidovou hmotnost, jeví se H- řetězec při gradientové separaci těžší než L-řetězec (Scheffler et al., 1999).

Řetězec mitochondriální DNA lze rozdělit na 2 oblasti – oblast kódující a kontrolní (nekódující) (Holland, Parson, 1999). V kódující oblasti se nachází 37 genů – 13 proteinů účastnících se oxidativní fosforylace, 22 transferových RNA a 2 ribozomální RNA. Kontrolní oblast je dlouhá přibližně 1122 párů bází a tato část mtDNA nekóduje geny. Nachází se zde počátek replikace H-řetězce, a to v oblasti zvané kontrolní úsek (D smyčka). Dále se zde vyskytují promotory těžkého a lehkého řetězce a nasedají zde transkripční faktory. V této oblasti též leží oblasti zvýšené frekvence vzniku mutací – hypervariabilní oblast 1 (HV-I), která se nachází mezi pozicemi 16024-16365 a hypervariabilní oblast 2 (HV-II), lokalizovaná mezi pozicemi 73-340. Pozice hypervariabilních oblastí, které mutují častěji než pozice ostatní, se nazývají hot spots. Mezi nejčastější typ mutace v této oblasti patří delece, inserce, repetice či substituce. Jelikož tato oblast nekóduje žádný důležitý protein, výskyt mutací v této oblasti není pro buňku fatální a je zde prostor pro zvýšenou variabilitu. V některých studiích se též pracuje s hypervariabilní oblastí 3 (HV -III), která leží v oblasti mezi pozicemi 438 – 574.

V roce 1981 se podařilo v laboratoři Fredericka Sangera v Cambridgi (Anderson et al., 1981) jako prvním osekvenovat mtDNA a osekvenovaná mtDNA byla označena jakožto CRS – Cambridge Reference Sequence (či též jako Andersonova sekvence). Každému nukleotidu této sekvence na L-řetězci bylo přiřazeno pořadové číslo. Pořadové číslo 1. bylo

arbitrárně stanoveno přibližně uprostřed kontrolní oblasti. Označení nukleotidů vzrůstá ve směru 5'→3' lehkého řetězce a poslední pozicí je díky kruhovému tvaru vedle pozice 1 – pozice 16569. Původní CRS byla v roce 1999 znovu osekvenována (Andrews et al., 1999) a došlo k opravení některých špatně určených pozic. Tato zrevidovaná sekvence se označuje rCRS a slouží jako standard, vůči kterému je analyzovaná mtDNA porovnávána.

5.2.3. Nomenklatura mutací mtDNA

Jak již bylo výše zmíněno, mezi nejčastější typ mutací patří delece, substituce, inserce či vznik SNP. Pokud dojde k substituci, na určité pozici dojde k záměně nukleotidů. Například dle rCRS se na pozici 2341 vyskytuje cytozin. Pokud se ve zkoumané mtDNA na této pozici nachází jiný nukleotid, například guanin, záměna se zaznamená jako 2341G. V případě delece u zkoumané mtDNA chybí na určité pozici nukleotid, což se zaznamená jako 2341D, 2341- či 2341d. Inzerce je typem mutace, kdy dojde k vložení nukleotidu. V tomto případě se zaznamená pořadové číslo nukleotidu před zaznamenanou inzercí, toto číslo je odděleno tečkou a zapíše se pořadí nově vložených nukleotidů spolu s jejich písmenným kódem – np. 2341.1G.

5.2.3.1. SNP

V případě, že substituce určité pozice a variantě (alele) vyskytuje v populaci s vyšší frekvencí než 1%, nazývá se tato mutace polymorfismem jedné pozice, nebo též SNP (single nucleotide polymorphism), který se řadí mezi sekvenční polymorfismy. Jelikož se SNPs nejčastěji vyskytují ve dvou možných variantách alel, jsou SNPs často označovány jakožto bi-alelické markery. Rozlišují se 4 třídy SNP, kam se řadí 6 binárních kombinací (Venter et al., 2001):

:

- SNP třída 1 – vzniká tranzicí jakožto záměna za nukleotid s bází stejného derivátu, jako je záměna G↔A (C↔T).
- SNP třída 2 – tato třída vzniká transverzí, kdy mutací dojde k náhradě nukleotidu C↔A (G↔T) bází jiného derivátu – T↔A (A↔T), C↔G (G↔C)

- SNP třída 3 – tento polymorfismus opět vzniká transverzí, a to záměnou C↔G (G↔C)
- SNP třída 4 – polymorfismus vzniká transverzí záměnou T↔A (A↔T)

Nejčastěji zastoupeným typem SNP je transice G↔A (C↔T), což má souvislost s 5-metylcytosinovou deaminací (Brookes, 1999).

Rozdílné vlastnosti každého z nukleotidů se projevují rozdílnou teplotou tání (T_m). Tato skutečnost se odráží ve vlastnostech teplot tání jednotlivých SNP tříd – největší rozdíl teplot tání nukleotidů je v SNP třídách 1 a 2, kde rozdíl hodnot teplot tání nukleotidů je větší než $0,8^\circ\text{C}$. Naopak nejmenší teplotní rozdíl je v SNP třídě 4. Těchto poznatků se využívá v SNP genotypizačních metodách pracujících na principu analýzy teplot tání. Přehled SNP tříd je zobrazen v Tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 – přehled SNP tříd

SNP třída	nukleotidová záměna	rozdíl teplot tání analyzovaných nukleotidů	výskyt v lidském genomu
1	C↔T nebo G↔A	<div style="text-align: center;"> rozdíl $T_m > 0,8^\circ\text{C}$ ↓ rozdíl $T_m < 0,2^\circ\text{C}$ </div>	64%
2	C↔A nebo G↔T		20%
3	C↔G		9%
4	A↔T		7%

5.2.4. Dědičnost mtDNA

Bylo prokázáno, že mitochondriální DNA je děděna po maternální linii (Giles et al., 1980). Při oplodnění vajíčka proniká do vnitřní části vajíčka pouze hlavička a střední část spermie. Tyto části spermie, na rozdíl od ocásku, obsahují pouze minimální množství mitochondrií, mezi 50-75 kopiemi (Simons, Cummins, 1996). V porovnání vajíčko obsahuje přibližně 10000x více mitochondrií než proniknuvší část spermie (Simons, et al., 1996). V případě, že se do vajíčka dostane parentální mtDNA, dochází k její selektivní

likvidaci (Hershko, et al., 1998). Systém selektivního odstranění parentální mitochondriální DNA je velmi rychlý, takže již před prvním mitotickým dělením není možné parentální mtDNA detekovat.

Porovná-li se výskyt mutací v nDNA a mtDNA, je jejich výskyt mnohem častější v mtDNA. Toto je dáno především skutečností, že se mtDNA vyskytuje v radikálovém prostředí. Dále hraje roli absence histonů chránících mtDNA, nižší přesnost mtDNA polymerázy (než je tomu u nDNA polymerázy) a s tím i souvisejícími nízkými reparačními mechanismy (Pinz, et al., 1998). Mutační rychlost oblasti hypervariabilních úseků je 5-10 krát rychlejší než u nDNA (Budowle et al., 2003). Z tohoto důvodu se na hypervariabilní oblasti I a II se zaměřuje forenzní genetika, zejména sekvenací těchto oblastí.

Především vlastnosti jako jsou vysoký počet molekul mtDNA v buňce, maternální dědičnost a nízká četnost rekombinace umožňují identifikaci biologického materiálu, jako například lidských ostatků, u kterých není možné použít identifikaci pomocí analýzy STR úseků. Identifikace lidských ostatků se však dá stanovit pouze v případě, že je k dispozici mitotyp (sekvence mtDNA) příbuzných po maternální linii – matky, sourozenců či jiných příbuzných této linie. V praxi bylo této analýzy užito například k určení obětí trosek WTC z 11. 9. 2001 či v hromadném hrobě rodiny zavražděného Cara Mikuláše II (Gill et al., 1994).

5.2.5. mtDNA haploskupiny

Další oblastí studia je genetika lidských populací a evolučních studií, díky potvrzení souvislosti vzniku SNP markerů a geografickým původem. Oblastí zájmu jsou takzvané haploskupiny. Mitochondriální haploskupina je definována souborem určitých SNP markerů lokalizovaných na mtDNA, díky kterému je možné určit geografický původ.

Pro SNPs je charakteristická nízká mutační rychlost, která je přibližně 10^{-8} na generaci a lokus, což přibližně znamená vznik jedné SNP za 1500 let (Brookes, 1999). U tohoto typu polymorfismu se jen zřídka vyskytuje zpětná mutace. Znamená to tedy, že v případě vzniku SNP zůstává v genofondu a je dále děděna z generace na generaci. Tím, jak se takovéto mutace kumulovaly v genofondu určitých migrujících populací, vznikl a přetrval

soubor SNPs, který následně definoval haploskupiny. Sledováním vhodně vybraných SNP markerů je možné mtDNA analýzou populací sestavit takzvaný fylogenetický strom vzniku mutací, díky kterému je možné odvodit geografický původ (Stoneking et al., 1994).

Původní rozdělení do haploskupin se vztahovalo k pozici mtDNA, kam se vázal restriční enzym *HpaI*. Korelace mezi restriční pozicí lokalizovanou na mtDNA a geografickým původem bylo prokázáno na studii porovnávající africké kmeny Bantů, Pygmejů a Křováků. U všech bylo analyzováno stejné restriční místo, konkrétně na pozici 3592. U ostatních populací se toto restriční místo nenacházelo. Užitím dalších vhodných restričních enzymů byla lidská populace rozdělena na základě restričních pozice do hlavních afrických, asijských a evropských haploskupin (Wallace et al., 1999).

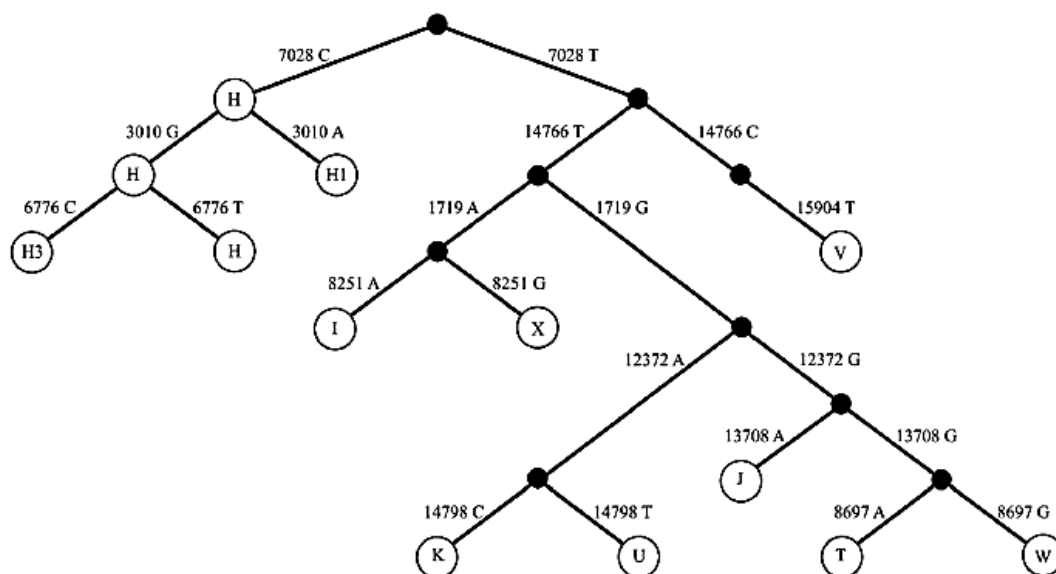
Od roku 2001 se přešlo k definování haploskupin pomocí souboru SNP markerů lokalizovaných jak v kódující, tak v kontrolní oblasti (Finnila et al, 2001). Haploskupiny byly uspořádány do takzvaného fylogenetického stromu, který umožňuje sledovat mateřskou linii od recentní populace až po „Mitochondriální Evu“ (označována jako mtMRCA – matrilineal most recent common ancestor), což je v mateřské linii společný předek všech dnes žijících lidí. Žena nesoucí tuto mtDNA žila přibližně před 200 000 lety, tedy po vzniku anatomicky moderního člověka a současně dlouho před vycestováním člověka mimo Afriku (Strauss, 1999).

Nejstarší a nejpůvodnější haploskupina lokalizuje původ svého vzniku do Afriky a je nazvána haploskupinou L. Dělí se na 4 hlavní subhaploskupiny, které jsou definovány velkým množstvím SNP markerů. Nejstarší větví je haploskupina L0, která se osamostatnila před 100 000 lety, lokalizuje se především v centrální a východní Africe. Haploskupina L1 je rozšířená zejména v centrální a jižní Africe, nejrozšířenější L2 haploskupina pak v centrální a západní Africe. Haploskupina L3 se nejčastěji vyskytuje v oblasti severní Afriky a právě štěpením této linie vznikly dvě linie, ze kterých vychází ostatní haploskupiny. Jedná se o haploskupinu M, která dala vzniknout všem asijským a americkým haploskupinám, a haploskupinu N, ze které jsou odvozeny evropské haploskupiny.

Z haploskupiny M jsou odvozeny skupiny A, B, C a D. K jejich odštěpování došlo v průběhu migrační vlny jdoucí skrz Asii a Sibir (přibližně před 50 000 lety). Díky zamrzlé Beringově úžině byl umožněn migrační tah přes Aljašku do Severní a Jižní Ameriky, a to přibližně v období 20 – 15 000 lety. Pro asijskou populaci jsou dále charakteristické haploskupiny F, G, K a M. Jelikož byl Americký kontinent osidlován v několika vlnách, a to i z Evropy, je u původních obyvatel Ameriky detekována haploskupina X, která je původně evropskou haploskupinou.

Hlavní haploskupiny Evropy jsou odvozeny od haploskupiny N – jedná se o haploskupiny H, I, J, T, U, V, W, a X. Vznik těchto haploskupin se pojí s osidlováním Evropy, které bylo započato přibližně před 30 000 lety. Nejrozšířenější středoevropskou haploskupinou je H, která je v populaci zastoupena ze 45% (Brandstätter et al., 2003, Brandstätter et al., 2005, Köhnemann et al., 2009). Tato skupina je definována původní variantou nukleotidu SNP na pozici C7028T – nachází se zde tedy nukleotid dle rCRS, cytosin. Výskyt thyminu na této pozici značí, že vzorek spadá pod jinou evropskou haploskupinu – I, J, K T U, V, W nebo X. Nejčastěji zastoupenou subhaploskupinou linie H je subhaploskupina H1, která je definována mutační alelou SNP G3010A. Zastoupení této linie je přibližně 14,5%.

Haploskupina H má mnoho subhaploskupin, krom již uvedené H1 je to H2, H3, H4 či H5. Druhou nejčetnější haploskupinou je haploskupina U v zastoupení přibližně 18,8%, přičemž skupina je definována mutačními nukleotidy SNP C14766T a G12372A. Mezi další početné evropské haploskupiny řadíme haploskupinu T se zastoupením 13,2% či haploskupinu J zastoupenou v 9% (Brandstätter et al, 2003, Brandstätter et al, 2005, Köhnemann et al, 2009). Na Obrázku č. 2 je znázorněn kladogram evropských haploskupin spolu s nukleotidovými variantami SNP markerů, kterými jsou dané haploskupiny stanoveny.



Obrázek č. 2. Kladogram evropských haploskupin a nukleotidové varianty SNP, kterými jsou tyto haploskupiny stanoveny (převzato z Brandstätter et al, 2003).

5.3. Analýza vzorků

5.3.1. Sběr a uchování trichologického materiálu

Sběr a uchování trichologického materiálu, který se dále zkoumá za účely forenzní genetiky, podléhá postupům a doporučení každé z laboratoří. Základním pravidlem sběru trichologického materiálu je zabezpečení kontaminace tohoto materiálu cizorodou DNA užitím rukavic či vhodného instrumentáře (pinzeta či jiné). Trichologický materiál je vhodný uchovávat v prodyšných materiálech (np. obálka) umožňující proschnutí vzorku. Uložení do klasického sběrného sáčku či gelové sběrné pásky může svojí neprodyšností způsobit hnilobné procesy a tím možnou degradaci nDNA, popřípadě poničení kořínku vlasu v anagenní fázi, což by též mohlo znemožnit analýzu nDNA z tohoto materiálu (Deedrick, 2001).

5.3.2. Izolace DNA

Izolace DNA z buněk tkání je prvním krokem genetické analýzy. Úspěšnost a výtěžnost této metody závisí další možnosti analýzy. V závislosti na typu tkání byla vyvinuta celá řada izolačních postupů, včetně komerčně užívaných kitů.

5.3.2.1. IZOLACE DNA Z TRICHOLOGICKÉHO MATERIÁLU

Při izolaci DNA z trichologického materiálu je zapotřebí mít na paměti, že izolací DNA je tento materiál spotřebován a není již možná další antropologická analýza. Proto je třeba k této analýze přistoupit až po morfoskopickém prozkoumání vzorku či dostatečném množství vzorku pro oba typy analýz.

K izolaci DNA z trichologického materiálu byla vyvinuta celá řada komerčně užívaných kitů, jako příklad bychom rádi uvedli izolační sadu Tissue and Hair Extraction Kit, kdy se tato sada užívá spolu s izolačním kitem DNA IQ. Tissue and Hair Extraction Kit umožňuje rozrušení odolných keratinizovaných buněk stvolu trichologického materiálu spolu s degradací a vymytím proteinů. Vazba molekul DNA (jaderné i mitochondriální) je umožněna paramagnetickou suspenzí, která je součástí kitu DNA IQ. Úseky kratší 80 bp velmi často inhibují proces PCR. Takto krátkým úsekům je znemožněno se na paramagnetickou suspenzi navázat a jsou s ostatními nízko i vysoce molekulárními látkami vymyty. Zároveň je tento izolační kit schopen odstranit vlasový pigment, který by jinak mohl inhibovat reakci PCR.

5.3.2.2. IZOLACE DNA Z BUKÁLNÍCH STĚRŮ

Metodou standardně užívanou ve forenzní genetice k izolaci vzorků obsahující vysoké množství DNA, jako jsou bukální stěr či stopy krve, je izolace pomocí suspenze pryskyřice Chelex 100 (dle Walsh et al., 1991).

Chelex je pryskyřice na bázi polymeru, která je schopna za alkalických podmínek vázat dvojmocné ionty kovů, jako například Mg^{2+} . Chelatace právě těchto iontů způsobuje inaktivaci nukleáz (např. DNázy), což zamezuje degradaci separované DNA. Principem metody je homogenizace, destrukce a degradace buněčných membrán a proteinů spolu

s denaturací DNA a jejím následovným uvolněním do roztoku suspenze. Chelex je díky svým vlastnostem inhibítozem amplifikační reakce, a proto je nezbytné vyloučit přítomnost pryskyřice v reakcích a analýzách navazujících na izolaci DNA.

5.3.3.KVANTIFIKACE DNA

Dalším krokem následujícím po izolaci DNA je jeho kvantifikace, neboli zjištění množství DNA v izolátu. Tento krok je důležitým pro ověření účinnosti izolační metody a je též důležitý pro další body analýzy – především pro PCR.

Nejčastěji užívanou kvantifikační metodou je v dnešní době kvantitativní Real-time PCR (RT-qPCR), což je metoda odvozená od PCR reakce. Proto tato metoda, stejně jako metoda PCR, funguje na principu cyklického opakování změn teplot za opakovaného ohřevu a ochlazení reakční směsi, kde za užití správných reagensů dochází k namnožení molekuly DNA. Při metodě RT-qPCR však dochází ke snímání fluorescence v průběhu amplifikace DNA, a to v reálném čase (Higuchi et al., 1992) s využitím fluorescenčního barviva (SYBR® Green) či TaqMan sondy.

TaqMan sonda je oligonukleotid označený na svém 5'konci fluorescenčním barvivem (reporter). Na 3'konci se nachází tzv. zhášec fluorescence, který svojí přítomností brání molekule reporter emitovat fluorescenční záření. Sonda TaqMan se váže do úseku mezi dvojicí primerů, určující amplifikovanou oblast. Jakmile polymeráza amplifikující daný úsek dojde na 5'konec sondy s navázaným reporterem, tak odštěpí fluorescenčně označený konec sondy. Uvolnění reporteru se projeví detekcí fluorescenčního záření.

Pro RT-qPCR proces je charakteristická křivka reakce, kterou lze rozdělit na tři oblasti – oblast exponenciální fáze, dále lineární fázi a fázi plató, kde již nedochází k amplifikaci vzorku díky vyčerpání některé z reagensů. Důležitým údajem pro zhodnocení počátečního množství DNA v izolátu je tzv. Ct hodnota, což je bod, kdy došlo k zaznamenání míry fluorescence nad určitou hranici (threshold). Čím je počáteční množství DNA v izolátu větší, tím dříve dojde k detekci fluorescence. Ct hodnota vzorku je pak porovnána s Ct hodnotou standardu o známé koncentraci DNA, díky čemuž je možné stanovit množství DNA ve vzorku.

5.3.4.AMPLIFIKACE DNA

PCR neboli „Polymerase chain reaction“ je biochemickou reakcí, kdy amplifikací několika málo kopií DNA může vzniknout dostatečný počet kopií určité sekvence DNA za pomoci DNA polymerázy. Aby polymeráza mohla úsek našeho zájmu namnožit, musí být daný úsek ohraničen párem primerů (oligonukleotidů), na které může polymeráza nasednout a úseky prodloužit.

Jak již bylo řečeno, tato metoda je založena na cyklickém opakování změn teplot, kdy dochází k opakovanému ohřevu a ochlazení reakční směsi. PCR je prováděna na přístroji zvaném termocycler, kde jsou vzorky uloženy v kovové destičce, která dle nastaveného protokolu zahřívá a ochlazuje vzorky o několik desítek stupňů v průběhu několika málo sekund. Na počátku cyklu dochází k rapidnímu vzrůstu teplot, díky kterému dochází k denaturaci DNA neboli oddělení řetězců. Takto oddělené řetězce poslouží jakožto templáty pro syntézu nových řetězců. Pokles teploty umožní nasednutí páru primerů, díky kterým může enzym – polymeráza nasednout na templát. Třetím krokem je pak zvýšení teploty na optimum, při kterém polymeráza nejlépe funguje.

PCR reakční směs se skládá z několika komponent. Každá z použitých reagensií musí být přítomna v optimálním množství a koncentraci. Nejdůležitější složkou, která umožňuje analyzovat úsek DNA našeho zájmu, je pár primerů. Primery jsou krátkými oligonukleotidy, které ohraničují úsek DNA, který má být amplifikován. Pro správné fungování PCR reakce je nezbytné správné stanovení jejich koncentrace v reakci.

Další důležitou součástí reakce je DNA polymeráza, která zajišťuje průběh amplifikace. Jelikož část reakce probíhá za denaturačních teplot, je nezbytné užití termostabilní DNA polymerázy, která by sama nedenaturovala při teplotě blízké bodu varu. Pro správný chod DNA polymerázy je nutné dodat optimální množství hořčiku a stavební jednotky – nukleotidy, ze kterých DNA polymeráza nasyntetizuje kopie nových řetězců DNA. V komerčním kitu je často směs DNA polymerázy, hořčnatých iontů a všech typů nukleotidů označována jakožto „Master Mix“, ve kterém je předem připravena směs těchto reagensií v optimálních koncentracích.

Aby reakce proběhla optimálně, je zapotřebí do reakce přidat přiměřené množství DNA. Jako optimální množství DNA je standardně užíváno 1 ng DNA (Edson et al., 2004), což je přibližně jaderná genetická informace 167 diploidních buněk. Při tomto množství by nemělo dojít k inhibici reakce PCR způsobené nadměrným množstvím DNA. Jaké množství vzorku izolátu DNA má být užito (popřípadě jakým způsobem izolát zředit), aby reakce PCR běžela optimálně, se zjistí z výsledků kvantifikace vzorků.

Spolu se sadou vzorků je též nutné amplifikovat tzv. negativní kontrolu neboli blank. Negativní kontrola obsahuje všechny použité reagenty, ale bez přidané DNA, místo vzorku se přidá dH₂O. Blank slouží ke kontrole čistoty chemikálií a vyloučení kontaminace. Standardně se užívá i pozitivní kontrola, což je komerčně vyráběná DNA známé sekvence a koncentrace, díky které je možné ověřit správnost proběhnuvší PCR.

Každý z cyklů PCR se skládá ze tří kroků. Počet cyklů u amplifikace nDNA se nastavuje dle protokolu amplifikačního kitu, při amplifikaci mtDNA se obvykle nastavuje 34 – 38 cyklů (Gabriel et al., 2003). Nedoporučuje se však nastavit více než 42 cyklů především z důvodu možného výskytu artefaktů, nespecifických produktů či poklesu účinnosti PCR (Gabriel et al., 2003).

Cyklus PCR:

- Denaturace – rozvolnění řetězců DNA. Zahříváním směsi po dobu 20 – 30 sekund při teplotě 94°C – 98°C dochází k rozrušení vodíkových vazeb spojující řetězec DNA, díky čemuž dojde k rozvolnění dvoušroubovice DNA. Takto oddělená vlákna jsou připravena k nasednutí primerů.
- Annealing – nasednutí primerů. V tomto kroku dochází ke snížení teploty na 50°C – 65°C. Takovéto snížení teploty umožní nasednutí primerů na specifické úseky DNA, přičemž specifita nasednutí primerů je dána sekvencí užitých primerů. Pro většinu primerů je též specifické teplotní optimum, při kterém nasedají na komplementární úsek DNA. Na takto připravené primery se poté může navázat DNA polymeráza, která může začít prodlužovat řetězec DNA.

- Elongace – fáze syntézy DNA vlákna. Na správně navázané primery může nasednout DNA polymeráza, která syntetizuje nové vlákno DNA. Optimální teplota se v této fázi odvíjí od užití DNA polymerázy, u nejběžněji užívané Taq polymerázy je toto teplotní optimum při 72°C. Syntéza nového vlákna probíhá ve směru od 5' konce ke 3' konci, přirůstající vlákno je komplementární k řetězci DNA, na kterém jsou navázány primery. Jinak řečeno DNA polymeráza prodlouží nasednuté primery od jejich 3' konce dle templátu.

Jedním z nejdůležitějších předpokladů úspěšné PCR zkoumaného úseku je správně navržený pár primerů. Aby reakce PCR probíhala co nejefektivněji a výsledek byl maximální, je nutné, aby použité primery byly specifické pro danou oblast amplifikace, měly přibližně stejnou teplotu nasedání či aby mezi sebou neinteragovaly za vzniku struktur „primer dimer“. Zároveň vybraný úsek, na který se primer váže, by neměl obsahovat pozice, které často mutují, jelikož špatné nasednutí primeru negativně ovlivňuje průběh amplifikace. Mezi další doporučení patří:

- délka primerů mezi 18 – 30 bp
- teplota tání v rozmezí mezi 55°C – 72°C
- poměr GC bází 40 – 60 %
- zamezení komplementarity v rámci jednoho primeru (zamezení tvorby struktury zvané „hairpin struktury“)
- rozdíl teplot tání páru primeru $\leq 5^\circ\text{C}$

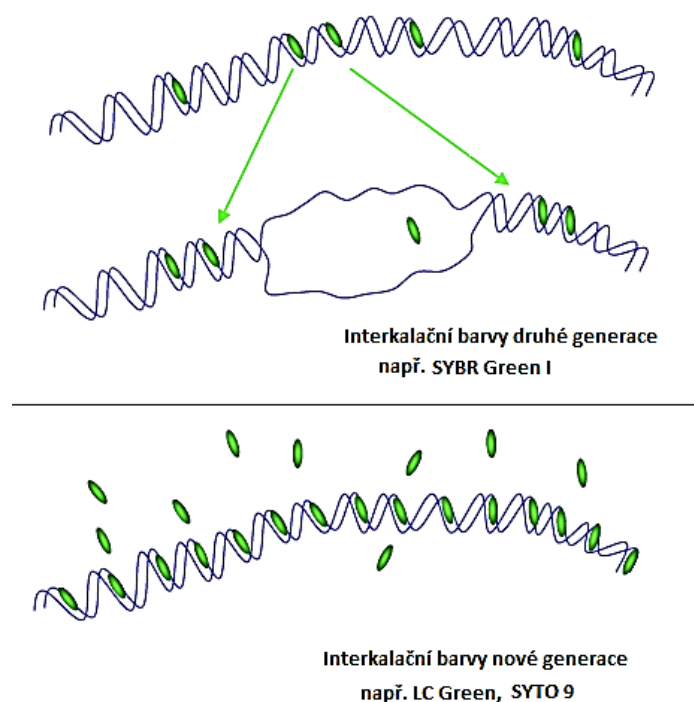
5.3.5.METODA HRM

Analytická metoda High resolution melting (HRM) přímo navazuje na amplifikaci cílené sekvence DNA pomocí PCR (proto HRM analýzu řadíme mezi post-PCR metody). Tato metoda umožňuje detekovat mutace, polymorfismy či epigenetické rozdíly dvoušroubovice DNA. Principem analýzy je sledování průběhu disociace dvoušroubovicové DNA (ds DNA) v jednošroubovici DNA (ss DNA) v závislosti na zvyšující se teplotě.

Prvotní analýzy pomocí křivky tání byly publikovány již v roce 1997 (Ririe et al., 1997), k zobrazení průběhu disociace bylo použito fluorescenční barvivo SYBR Green I

(interkalační činidlo, které se nespecificky váže pouze do struktury ds DNA, řadí se mezi interkalační činidla druhé generace). Protože zvýšené množství SYBR Green I působí jako inhibitor PCR (Wittwer et al., 1997), bylo nezbytné před samotnou analýzou křivky tání doplnit vysoké množství tohoto interkalačního činidla do reakce (Lipsky et al., 2001). Jelikož jakákoliv manipulace či doplňování reagensů v průběhu reakce zvyšuje riziko vzniku nežádoucích mezireakcí a zvyšuje pravděpodobnost kontaminace, je obecnou snahou vyvíjet tzv. closed-tube metody, při kterých v průběhu analýzy nedochází k žádným zásahům do reakce.

V první HRM closed-tube metodě bylo užito fluorescenčně označeného primeru (respektive jednoho z páru primerů) (Gundry et al., 2003). Nevýhodou této metody je nutnost užití fluorescenčně označeného primeru, neboť rapidně navyšuje cenu reakce. Díky uvedení tzv. nové generace interkalačních barev, byla vyvinuta metoda HRM mající dnešní podobu (Wittwer et al., 2003). Pro tyto interkalační barvy nové generace je charakteristická schopnost vmezeření do všech struktur ds DNA, aniž by užitá koncentrace inhibovala průběh PCR (zobrazeno v Obrázku č. 3). Díky plné saturaci nedochází v průběhu rozvolňování řetězců k přeskupování barviva a analýza je mnohem přesnější – což umožňuje zaznamenat i nejmenší rozdíl mezi řetězci, jako je jednobázový polymorfismus (SNP).



Obrázek č. 3. Porovnání vazby interkalační barvy druhé a nové generace. V horní části obrázku je zobrazena vazba interkalační barvy druhé generace (zde SYBR Green I) do ds DNA. Jelikož je nutné užít nižší koncentraci barviva, nemůže se navázat do všech struktur ds DNA a tudíž při rozvolnění řetězců (a tím i uvolnění interkalační barvy) dochází k redistribuci barvy do neobsazených vazeb dvouřetězce. Tato redistribuce významně ovlivňuje stanovení teploty tání amplifikátu. V dolní části obrázku je zobrazena vazba interkalační barvy nové generace do vazeb ds DNA. Převzato z HRM Assay Design and Analysis CorProtocol, který je k dispozici na www.corbettlifescience.com

Téměř každá firma uvedla na trh „svoji“ novou interkalační barvu, jako Idaho Technology LCGreen[®], Biotium Inc. EvaGreen[™], Invitrogen barvu SYTO[®]9 či v této studii (tj. laboratoří KUP) používanou barvou LightCycler[®] 480 High Resolution Melting Dye od Roche.

Průběh reakce je kontinuálně zachycen optikou, která je schopná zaznamenat fluorescenční záření užitých fluorescenčních barvy. Tím, jak se v dvoušroubovici DNA rozvolňují vazby mezi řetězci, dochází i k uvolňování interkalačního činidla, což se projevuje poklesem snímané fluorescence.

Křivka tání zobrazující průběh disociace DNA má tvar sigmoidy. Analýza teplot tání amplifikátů začíná při nízké teplotě, přibližně při 40°C, kdy veškerá DNA je ve formě dvoušroubovice. V této fázi jsou dvoušroubovice DNA plně saturovány, a proto je míra fluorescence na nejvyšší hodnotě. Spolu se zvyšováním teploty dochází k postupnému rozvolňování struktury DNA (a tím uvolňování fluorescenční barvy), což se projevuje poklesem měřené fluorescence. Oblast nejrychlejšího poklesu fluorescence se nazývá fází tání. Pokud se i nadále zvyšuje teplota, veškerá ds DNA disociuje v ss DNA, což má za následek vyvázání veškeré interkalační barvy z DNA – míra fluorescence je na nejnižší naměřené teplotě a přechází v plató. Naměřená křivka tání je pro další analýzu derivována, tedy křivka je převedena v první zápornou derivaci ($-dF/dT$ je funkcí T). Jelikož je teplota tání amplifikátů definována jako bod, ve kterém je polovina ds DNA rozvolněna v ss DNA, odpovídá tomuto bodu 50% hodnota fluorescence.

Teplota tání amplifikátu je především odrazem její délky a složením nukleotidů. Pokud se v řetězci bude vyskytovat pouze jedna pozice SNP, kdy nukleotid G bude substituován za T, řetězec obsahující mutaci bude mít nižší teplotu tání z důvodu nižší stability dvojvazného T nukleotidu (a tím i nižší teploty rozštěpení vazeb). Vzorky obsahující homozygotní varianty alel budou mít paralelní průběh křivek teplot tání, budou se pouze lišit teplotou. U heterozygotních vzorků je teplota tání nižší než u homozygotních vzorků, což je dáno nižší stabilitou duplexů. Křivka tání též většinou obsahuje dvě domény tání. V případě analýzy mtDNA se homozygotní a heterozygotní vzorky nerozlišují.

Doporučené nastavení běhu HRM:

- Po PCR ihned následuje ochlazení směsi na 40°C, což zaručuje reasociaci všech ss DNA do ds DNA.
- Rámec teploty tání se odvíjí od průběhu tání produktů PCR. Pro počáteční nastavení se doporučuje interval mezi 60°C a 95°C. Poté, co dojde k optimalizaci, je možné tento interval snížit do rozmezí 25°C. Snímání teploty tání však musí začít minimálně 10°C před a skončit minimálně 5°C po předpokládané teplotě tání amplifikátů.
- Aby přístroj mohl správně vyhodnotit teplotu tání, je nezbytné správné nastavení počtů snímání fluorescenčního signálu (acquisition) na 1°C. Nastavení doporučené

výrobce je 25 měření na 1°C a toto nastavení jsme v průběhu optimalizace neměnili.

5.3.6.SEKVENACE DNA

Metoda umožňující zjistit přesné pořadí nukleotidů v sekvenci DNA se nazývá sekvenace. Bylo vyvinuto několik metod umožňující sekvenaci DNA, nejčastěji užívanou metodou je tzv. Sangerova metoda sekvenování, původně opublikována v roce 1977 (Sanger et al., 1977).

Sekvenování pomocí Sangerovy metody funguje na podobném principu jako reakce PCR, zde je však navíc užito kromě deoxyribonukleotidových bází (dNTP) potřebných k prodloužení amplifikovaného řetězce DNA i setu tzv. terminačních deoxyribonukleotidových bází (ddNTP), které růst amplifikovaného řetězce ukončují (Sanger et. al., 1977). Toto je způsobeno skutečností, že ddNTP neobsahují 3' hydroxylovou skupinu, jejíž přítomnost je nezbytná pro navázání dalšího nukleotidu. Absence této skupiny inhibuje další prodlužování řetězce DNA polymerázou, jelikož po zařazení ddNTP nukleotidu ukončuje svoji činnost. Užitím vhodného poměru ddNTP a dNTP (např. 1:100), vzniká směs produktů různé délky, které se mezi sebou liší vždy o jeden nukleotid. Ve finálním kroku dochází k separaci fragmentů dle jejich délky, neboť jsou ddNTP fluorescenčně označeny a tak je možné stanovit pořadí sekvence vybraného úseku DNA.

Aby bylo možné přechíst pořadí nukleotidu v dané sekvenci, přidává se do sekvenační reakce pouze jeden z páru primerů, ať již forward či reverse. Aby bylo možné rozlišit, který z ddNTP je navázán na každý z fragmentů, je každý typ ddNTP označen fluorescenční barvou. ddTTP (thymín) je označen červenou fluorescenční barvou, ddCTP (cytosin) modrou barvou, ddATP (adenin) červenou a ddGTP (guanin) je označen žlutou fluorescenční barvou. V dnešní době se k sekvenaci používá komerčně vyráběného sekvenačního kitu, který obsahuje směs všech typů dNTP a ddNTP v optimálním poměru.

Sekvenace se skládá z následujících kroků:

- **Amplifikace.** Prvním krokem sekvenace je amplifikace úseku DNA párem primerů. Amplifikace probíhá na přístroji umožňující sledovat průběh RT-qPCR (například na přístroji Light Cycler) a analýzu průběhu amplifikace je možné využít jakožto kvantifikaci. Dle míry fluorescence je možné stanovit, jaké množství produktu bude v následujícím kroku užito k sekvenování. Stanovení správného množství je důležité, jelikož pokud je ve finální reakci užito příliš velké množství fragmentů, detekce a stanovení nukleotidu příslušné pozice je znemožněno příliš silným signálem.
- **Purifikace amplifikátu I.** Cílem purifikace amplifikátu je odstranění v reakci nespotřebovaných dNTP a primerů – mechanickou separací za užití Microcon 100 či chemickou cestou užitím exonukleázy I
- **Sekvenační reakce.** Po přečišťovací reakci následuje reakce sekvenační, často nazývaná jako asymetrická reakce. Aby bylo možné vyhodnotit jednotlivé nukleotidy přiřazené k pozicím sekvence, užívá se k sekvenaci pouze jednoho z párů primerů spolu se směsí dNTP a ddNTP.
Při sekvenaci vzorku se vždy analyzuje vzorek v dubletu, kdy se ověřuje pořadí nukleotidů vzniklé z každého primeru zvlášť.
- **Purifikace amplifikátu II.** Cílem purifikace reakční směsi je odstranění v reakci nespotřebovaných primerů a směsi dNTP a ddNTP mechanickou či chemickou cestou.
- **Analýza fragmentů.** Sekvence mtDNA byla stanovena za užití přístroje pro kapilární elektroforézu – sekvenátoru.

Analýza fragmentů a stanovení pořadí nukleotidů se v dnešní době standardně provádí na kapilární elektroforéze (CE). Principem této metody je separace fragmentů v poli elektrického napětí, kdy fragmenty putují viskózním polymerem od záporně nabitě katody ke kladně nabitě anodě. Rychlost pohybu fragmentů je dána jejich délkou, přičemž kratší fragmenty se pohybují polymerem rychleji než fragmenty delší, jejichž rychlost pohybu je snížena pórovitostí polymeru.

Mezi základní komponenty kapilární elektroforézy patří skleněná kapilára, dvě elektrody propojené elektrickým napětím a nádobky obsahující pufr. Blízko konce kapiláry je lokalizován laser a detektor fluorescence. Skleněná kapilára má délku je 25 – 75 cm

o vnitřním průměru 50 – 100 μm . Před samotným nasátím vzorku je do kapiláry nasáto příslušné množství polymeru. Následuje nasátí roztoku vzorku a průchod fragmentů kapilárou, kdy díky rozdílné délce dojde k rozdělení fragmentů dle jejich délky, respektive stejně dlouhé produkty se pohybují kapilárou stejnou rychlostí.

Samotná detekce fragmentů probíhá v detekční oblasti lokalizované při ústí kapiláry a analýza je umožněna detekcí emitovaného světla z fluorescenčně značených ddNTP. Po ozáření fragmentů pulzní vlnou z laseru dojde k emisi světla o určité vlnové délce. Tato emise je zachycena optikou (např. CCD kamerou), která zaznamená množství uvolněného světla. Výsledná sekvence je pak zaznamenána do formy elektroforetogramu.

6. MATERIÁL

Pro tuto diplomovou práci byly použity především vzorky trichologického materiálu (více viz níže), které jsou používány ve forenzních případech jako zajištěné stopy. Protože se tato diplomová práce zabývá analýzou mtDNA trichologického materiálu neobsahujícího nDNA, jako nejvýhodnější se jevílo využít stávajících metod a postupů forenzní laboratoře KUP a pokusit se je dále rozvinout.

Běžný postup laboratoře KUP při přijímání trichologického materiálu nalezeného na místě činu od kriminalistických techniků je ohledání tohoto nálezu na oddělení biologie (antropologická zkoumání) KUP. Trichologický materiál se standardně ohledává a analyzuje pomocí mikroskopu Olympus BX50 F-3, kde jsou vzorky pozorovány v procházejícím světle. Dle standartního postupu, v případě absence nDNA (vzorky trichologického materiálu v telogenní či v anagenní fázi) se genetická analýza tohoto biologického materiálu neprovádí. Tento materiál se dále vyšetřuje pouze v případě, že se jedná o závažný kriminální čin opravňujícího zvýšené úsilí, či v případě omezeného množství důkazů.

Po konzultaci s RNDr. Dvořákem z biologické sekce oddělení KUP jsme se rozhodli pro sběr dvou skupin vzorků trichologického materiálu. První skupinou vzorků jsou sady trichologického materiálu v anagenní fázi, kdy od každého jedince byly odebrány vzorky vlasů, axilárního ochlupení, pubického ochlupení a k porovnání vyizolované mtDNA též bukalní stěr daného jedince. Druhou skupinou vzorků jsou sady vlasů v telogenní fázi. Pro porovnání vyizolované mtDNA byl od každého jedince vždy odebrán i bukalní stěr.

6.1. Sada trichologického materiálu v anagenní fázi

Ke sběru tohoto materiálu bylo využito celkem 12 dobrovolníků, z čehož 8 bylo žen a 4 mužů ve věku od 18 – 30 let, kteří neměli chemicky upravené vlasy. Vybraní jedinci nebyli v příbuzenském vztahu po maternální linii. Dobrovolníci byli obeznámeni s cíli diplomové práce a spolu s odevzdáním vzorků byl podepsán informovaný souhlas. Vzorky byly vedeny jako anonymní, uloženy pod číselným kódem spolu s označením, o jaký typ trichologického materiálu se jedná. Od každého dobrovolníka byla získána série vlasů,

axilárního a pubického ochlupení o minimální délce 2 cm. Sběr ochlupení se prováděl pomocí pinzety, která byla vždy očištěna 98% etanolem. Vzhledem k délce trichologického materiálu a plánovanou úpravou tohoto materiálu (dodatečné odstranění kořenové části spolu s pochvou folikulu obsahující jadernou DNA), byl trichologický materiál uložen na sběrné karty užívané KUP ke sběru a uchování stop. Každá z karet byla označena číselným kódem s písmenným označením typu trichologického materiálu (vl, ax, pub) spolu s označením pohlaví. Celá série jednoho jedince byla takto uchovávána vždy pohromadě v jedné obálce. Bukální stěr byl sejmut pomocí tamponu standardně užívaného k těmto účelům na KUP.

Příprava vzorků k izolaci probíhala v laboratoři, která je určená k manipulaci a izolaci DNA z materiálů obsahující malé množství DNA v tzv. LCN laboratoři. V laboratoři se vždy užívalo ochranných pomůcek – ochranný oděv, ochranná pokrývka hlavy, rouška a rukavice. Veškerý instrumentář, jako jsou nůžky či skalpel, byl vždy před kontaktem s novým vzorkem trichologického materiálu řádně očištěn 98% ethanolem. Po ukončení práce byla vždy pracovní plocha desinfikována pomocí Incidur Spray. Pro odstranění DNA byl užit DNA Remover.

Před samotnou izolací mtDNA byl z každého vzorku odříznut úsek o délce 1 cm obsahující kořínek a obaly vlasového stvolu – tímto se odstranila část obsahující nDNA. K izolaci byl použit úsek navazující na odříznutou část, a to o délce 3 cm. Pokud dodané vzorky byly kratší než 3 cm, byl přidán další vlas ošetřený stejným způsobem tak, aby celková délka trichologického materiálu ve zkumavce byla 3 cm. K vyříznutí požadované části vlasu byl užit skalpel. Odříznutý vlas a chlup byl propláchnut pod proudem 98% etanolu a uložen do 1,5 ml zkumavky. Propláchnutí etanolem jsme zvolili především proto, aby se odstranila eventuální přítomnost zbytku gelu ze sběrných karet a možnou kontaminaci cizorodou DNA. Pro lepší rozklad a izolaci mtDNA z vlasu jsme ve zkumavce trichologický materiál rozstříhali na co možná nejkratší úseky tak, aby veškerý materiál mohl být v průběhu izolace zcela ponořen v izolačním roztoku. Každá zkumavka byla označena příslušným číselným kódem a označením, o jaký typ trichologického materiálu se jedná. Po uložení trichologického materiálu do zkumavek následovala izolace mtDNA. Na Obrázku č. 4 je zobrazen vlas v anagenní fázi.



Obrázek č. 4. Vlas v anagenní fázi, zvětšení 100x, foceno na mikroskopu Olympus BX50 F-3. Na snímku je patrná měkká část kořínku. Nad kořínkem je dobře patrný tmavý proužek, což je tzv. keratinizační zóna, ve které probíhá keratinizace vlasu. Foto autor.

6.2. Sada trichologického materiálu v telogenní fázi

Ke sběru vlasů v telogenní fázi bylo využito 17 dobrovolníků, 10 žen a 7 mužů ve věku od 18 do 30 let. Dárci trichologického materiálu byli vybráni dle stejných podmínek jako dárci trichologického materiálu v anagenní fázi. Jelikož jsme se rozhodli pro zařazení tohoto typu vlasů až v průběhu studie, dárci vlasů v telogenní fázi se neshodují s dárce trichologického materiálu v anagenní fázi.

Od každého jedince bylo odebráno několik vzorků vlasů. Jelikož se jedná o vlasy vypadávající samovolně, sběr probíhal tak, že dobrovolník se předklonil a jemně si pročísl vlasy nad obálkou. Buď byly vlasy zachyceny v obálce, popřípadě byly sejmuty uchycené vlasy na rukou. Zalepená obálka s vlasy byla označena číselným kódem spolu s označením pohlaví. Dobrovolníkům byl též odebrán bukální stěr tamponem k tomu určeným. Samotný výběr vhodných vlasů byl proveden v laboratoři antropologické sekce KUP pomocí mikroskopu.

Odebrané vlasy byly umístěny na podložním sklíčku, které bylo očištěno v 98% roztoku etanolu, imobilizovány pomocí dH₂O a zafixovány krycím sklíčkem. K analýze vlasů jsme použili mikroskop Olympus BX50 F za využití procházejícího světla. Vzorky vlasů jsme prohlíželi na objektivu zvětšující 4x a 10x. Jelikož užitý okulár má zvětšení 10x, celkové zvětšení vzorků bylo 40x – 100x. Vybrané vlasy v telogenní fázi byly zkráceny na délku přibližně 3 cm (včetně kořínku) a uloženy do 1,5 ml zkumavky.

Po přenesení vzorků vlasů z oddělení antropologie do laboratoře LCN byl vlas vyjmut ze zkumavky a propláchnut 98% etanolem. Následně byl vlas uložen do 1,5 ml zkumavky, která byla označena číselným kódem a označením, o jaký typ materiálu se jedná. Materiál byl upraven stejným způsobem jako trichologické vzorky v anagenní fázi. Tímto byly vzorky připraveny k izolaci mtDNA. Na Obrázku č. 5 je zobrazen vlas v telogenní fázi.



Obrázek č. 5. Snímek vlasu v telogenní fázi, pořízen na mikroskopu Olympus BX50 F-3, zvětšení 100x. Foto autor.

6.3. Sada bukálních stěrů užitá k optimalizaci vybraných primerů

K optimalizaci užitých primerů a ověření jejich funkčnosti bylo kromě bukálních stěrů získaných spolu s trichologickým materiálem užito bukálních stěrů od 14ti dárců, z čehož bylo 5 žen a 9 mužů ve věku od 18 do 30 let. Dárci bukálních stěrů byli vybráni dle

stejných parametrů jako dárce trichologického materiálu. Manipulace s těmito bukálními stěry probíhala stejným způsobem jako u bukálních stěrů darovaných se vzorky trichologického materiálu.

7. METODY

7.1. Izolace DNA

K izolaci DNA z trichologického materiálu i bukalního stěru jsme užíli standardně užívaných postupů na KUP.

7.1.1. Izolace DNA z trichologického materiálu

K izolaci mtDNA ze všech typů testovaného trichologického materiálu (vlasů, ochlupení v oblasti podpaží a třísel) bylo užito izolační sady Tissue and Hair Extraction Kit spolu s izolačním kitem DNA IQ. Při izolaci trichologického materiálu jsme postupovali dle protokolu uvedeným výrobcem.

Do zkumavky s vlasem či ochlupením jsme přidali 100 μ l čerstvě připraveného inkubačního pufru. Tuto směs je nutné vždy před užitím připravit čerstvou z reagií v poměru:

Incubation buffer	800 μ l
1 M DTT	100 μ l
PK	100 μ l

Po přidání inkubačního pufru do zkumavky s vlasy jsme směs zamíchali a nechali inkubovat na vyhřívané třepačce při 56°C po dobu 1 h. Po inkubaci jsme vzorky umístili do stojánku a přidali 200 μ l Lysin Buffer (lyzační puf) spolu se 7 μ l resuspendované paramagnetické suspenze. Směs byla řádně promíchána na rotační třepačce a inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 minut.

Po inkubaci následovalo promíchání na rotační třepačce a vzorky jsme umístili do magnetického stojánku. Následně jsme opatrně odpipetovali roztok ze dna zkumavky (paramagnetické kuličky s navázanou DNA byly díky magnetickým silám poutány na stěně ependorfky). Do zkumavky bylo přidáno 100 μ l lyzačního pufru. Po promíchání vzorku na rotační třepačce byl vzorek umístěn do magnetického stojánku a byl odstraněn roztok lyzačního pufru. Do zkumavky bylo přidáno 100 μ l Wash Buffer (promývací puf),

po promíchání na rotační třepačce byla zkumavka vrácena zpět do magnetického stojánu a roztok byl opatrně odstraněn.

Krok promytí paramagnetických kuliček roztokem lyzačního a promývacího pufru byl proveden ještě dvakrát. Při posledním promytí roztokem promývacího pufru je důležité odebrat maximum roztoku a nechat paramagnetické kuličky vyschnout při otevřeném víčku zkumavky při laboratorní teplotě, neboť další přítomnost tohoto roztoku v reakci by kolidovala působení dalších chemikálií. Doporučená doba schnutí je 5 – 10 minut. Výrobce nedoporučuje přesáhnout dobu schnutí 20 minut, jelikož by to mohlo negativně ovlivnit uvolnění DNA z paramagnetických částic. Do zkumavky jsme napipetovali 30 μ l Elution Buffer (uvolňovací pufr), řádně promíchali na rotační třepačce po dobu 5 s a inkubovali ve vyhřívané třepačce po dobu 5ti minut při 65°C. Po promíchání byly vzorky umístěny do magnetického stojánu. Následně se DNA uvolnila z paramagnetických kuliček do roztoku uvolňovacího pufru a roztok se opatrně přenesl do finálních zkumavek.

7.1.2. Izolace DNA z bukálních stěrů

Izolace DNA bukálních stěrů byla provedena v laboratoři určené k izolaci DNA materiálů obsahujících vysoké množství kopií dědičné informace, v takzvané HCN laboratoři.

K izolaci DNA z bukálních stěrů bylo užito suspenze pryskyřice Chelex 100 a postupovalo se dle následujícího protokolu:

Nejprve byl tampon Dispolab s bukálním stěrem odměřen v 1 ml dH₂O po dobu 30 minut při laboratorní teplotě, zkumavka s tamponem byla průběžně promíchávána. Následně jsme tampon opatrně vyjmuli a zkumavku s lyzátem buněk centrifugovali na centrifuze po dobu 3 minut při rychlosti 13 000 rpm a následně jsme opatrně odsáli supernatant. Toto je nutné provést tak, aniž by byla odsáta peleta (tj. sediment na dně po centrifugaci). Do zkumavky jsme přidali 4 μ l proteinázy K a 200 μ l 5% suspenze Chelex 100. Tato směs byla inkubována na vyhřívané třepačce při teplotě 56°C po dobu 30 minut, poté jsme DNA denaturovali při teplotě 98°C po dobu 8 minut. Na závěr byla směs centrifugována

při rychlosti 13 000 rpm po dobu 1 min, díky čemuž došlo k uvolnění DNA do supernatantu.

7.2. Kvantifikace DNA

Jelikož se na KUP nevyužívá ke kvantifikaci žádný komerčně (ani pro vědecké účely) vytvořený kit stanovující kvantitu mtDNA v izolátu (spolu se standardizovaným vzorkem o známém obsahu mtDNA, podle kterého by bylo možné kvantitu separované mtDNA porovnat a tím i určit množství vyizolované genetické informace), kvantifikace mtDNA prováděna nebyla. U bukálních stěrů byla prováděna kvantifikace nDNA standardně užívaným komerčním kitem. U izolátu DNA vzorků trichologického materiálu kvantifikace nebyla provedena standardně z důvodu absence nDNA v tomto typu vzorků. Protože se předpokládá úměra mezi množstvím nDNA a mtDNA v izolátu, užili jsme údaje z kvantifikace především proto, aby do další reakce bylo užito u všech vzorků přibližně stejné množství mtDNA podle údajů o kvantitě nDNA v izolátu.

Protože se v dalších krocích (amplifikace pomocí PCR, analýza amplifikátu metodou HRM a sekvenací úseku mtDNA) užívalo primerů, které se váží přímo na mtDNA, bylo možné analyzovat průběh amplifikace i přibližnou Ct, díky čemuž je možné zhodnotit, do jaké míry byla izolace mtDNA ze vzorků úspěšná.

7.2.1. Kvantifikace nDNA bukálních stěrů

Ke kvantifikaci nDNA bylo užito komerčního kitu Quantifiler Human, v němž se TaqMan sondy specificky vážou na sekvenci pátého chromozomu, sekvence 5p15.33, délka amplifikované sekvence byla 62 bp.

V kvantifikační reakci bylo vždy užito 10,5 µl Primer Mix, 12,5 µl PCR Reaction Mix a 2 µl vzorku, přičemž každý vzorek byl připravován v dvojici (dubletu). Vzorky byly kvantifikovány v 96 jamkové destičce, které byly překryty speciální fólií. Kvantifikace a analýza vzorků proběhla na LightCycleru.

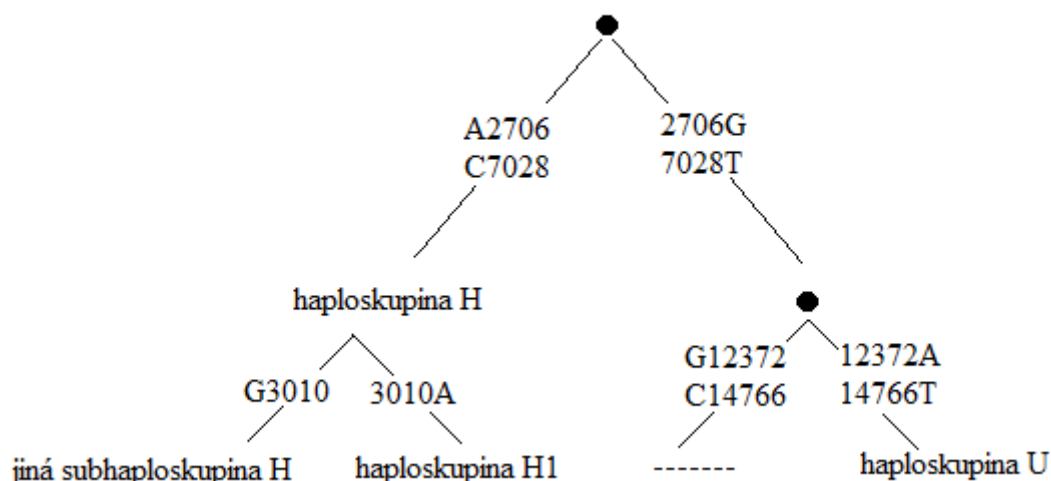
7.3. Amplifikace pomocí PCR

7.3.1. Výběr SNP a příslušných primerů

Aby bylo možné v testované sérii vzorků zachytit obě alelické varianty vybraných SNP markerů, bylo nutné vybrat takové pozice polymorfismů, které se v populaci vyskytují v dostatečně vysoké míře. Z toho důvodu jsme se rozhodli pro takové SNP markery, které stanovují nejčtenější evropské haploskupiny. Toto mělo zajistit detekovatelné množství variant alel v námi zkoumaných vzorcích. Bylo vybráno celkem 5 SNP markerů, které stanovují následující haploskupiny:

- A2706G – výskyt nukleotidu A zařazuje vzorek do haploskupiny H
- C7028T – detekce nukleotidu C na této pozici zařazuje vzorek do haploskupiny H. Pro úspěšné zařazení do haploskupiny H je postačující úspěšná detekce jedné z těchto výše uvedených dvou pozic.
- G3010A – substituční nukleotid A zařazuje vzorek do subhaploskupiny H1. Zařazení do subhaploskupiny je podmíněno výskytem nukleotidu C na SNP C7028T nebo nukleotidu A na SNP A2706G.
- G12372A – mutovaná alela A řadí vzorek do haploskupiny U. To je podmíněno současným výskytem nukleotidu T na SNP C7028T spolu s nukleotidem T na SNP C14766T.
- C14766T – mutovaná alela T řadí vzorek do haploskupiny U. Za současného výskytu nukleotidu T na SNP C7028T a nukleotidu A na SNP G12372A.

Grafické znázornění vztahů jednotlivých SNP markerů je zobrazeno na Obrázku č. 6.



Obrázek č. 6. Kladogram vybraných SNP markerů. Na obrázku jsou patrné kombinace nukleotidových variant SNP markerů, na základě kterých jsou stanovovány určité haploskupiny. Kombinace markerů G12372 a C14766 nestanovuje žádnou haploskupinu.

Studie, ze kterých jsme čerpali příslušné SNP markery, byly vedeny autorským kolektivem doktora Parsona (Brandstätter et al. 2003, Parson et al. 2003, Brandstätter et al. 2005, Köhnemann et al. 2009, Niederstätter et al. 2009). Tyto studie byly prováděny po dobu několika let na středoevropské populaci, a to na souborech s velkým počtem jedinců. Příkladem může být studie Brandstätter et al., 2009, kde testovaný soubor čítal na 2214 dobrovolníků. Předpokládali jsme tedy relevantní výskyt obou alel pro každý z SNP markerů i v námi testovaném souboru vzorků. Vybrané SNP markery též jeví jako vhodné k analýze metodou HRM, jelikož všechny polymorfismy spadají do SNP kategorie 1. třídy, díky čemuž je možné předpokládat detekovatelný teplotní rozdíl u nukleotidových variant jednotlivých markerů.

První sérii testovaných primerů jsme se rozhodli převzít z publikací Brandstätter, Parson and Parson (2003) a Niederstätter and Parson (2009). Ačkoliv byly tyto primery užity pro analýzu pozic jinou metodou (SNaPshot), jeví se jako vhodné k amplifikaci a analýze metodou HRM (viz Tabulka č. 2).

Tabulka č. 2. Přehled převzatých primerů k vybraným SNP markerům..

SNP pozice	původní / mutovaný nukleotid	primer forward a reverse	citace
A2706G	A / G	GTGAAGAGGCGGGCCTG TGCTCTTCTGGGATACCTCGAAA	Niederstaetter - Parson, 2009
G3010A	G / A	CGACCTCGATGTTGGATCAGGACA CGAACCTTTAATAGCGGCTGCACCAT	Brandstaetter, Parson – Parson, 2003
C7028T	C / T	GCAAACCTCATCACTAGACATCGTACTACACGACA CGAACCTTTAATAGCGGCTGCACCAT	Brandstaetter, Parson – Parson, 2003
G12372A	G / A	TGCAACTCCAAATAAAAAGGTAATAACCATGCACA GGGTTAACGAGGGTGGTAAGGATGGG	Brandstaetter, Parson – Parson, 2003
C14766T	C / T	ATCGTTGTATTTCAACTACAAGAACACCAATGACC GTGGGGAGGTCGATGAGTGAGTGGTTA	Brandstaetter, Parson – Parson, 2003

Jelikož se amplifikační reakce těchto převzatých primerů nepodařilo optimalizovat (blíže v kapitole Výsledky), byla navržena série nových primerů k vybraným SNP markerům. Primery byly navrženy v programu Primer3 (v 0.4.0.), dle výše uvedených doporučení designu primerů. Samotné primery byly připraveny firmou TIB[®] MolBiol. Aby bylo možné amplifikáty analyzovat metodou HRM, navržené primery navíc splňovali kromě standardních doporučení:

- celková délka produktu amplifikace je menší než 100 bp
- amplifikát neobsahuje další polymorfní místo, které by mohlo ovlivnit teplotu tání amplifikátu a tím i stanovení nukleotidové varianty na námi vybrané SNP pozici

Sekvence navržených primerů jsou uvedeny v Tabulce č. 3.

Tabulka č. 3. Přehled navržených primerů k jednotlivým SNP markerům..

SNP pozice	původní / mutovaný nukleotid	primer forward a reverse	délka amplifikátu	SNP třída
A2706G	A / G	AAATTGACCTGCCCCTGAA TCCATAGGGTCTTCTCGTCTT	59 bp	1
G3010A	G / A	TAGAGTCCATATCAACAATAG TGAACAAACGAACCTTTA	90 bp	1
C7028T	C / T	CACTAGACATCGTACTACA CCTATGATGGCAAATACAG	88 bp	1
G12372A	G / A	ACCATGCACACTACTATAACC TAACGAGGGTGGTAAGGATG	70 bp	1
C14766T	C / T	CAACTACAAGAACACCAATGA GGAGGTCGATGAATGAGT	81 bp	1

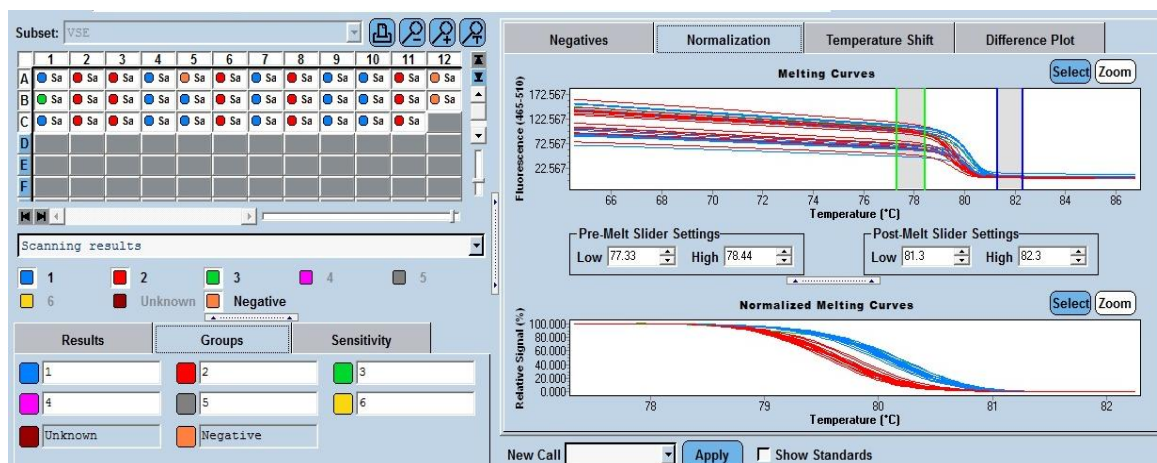
7.3.2. Obecné schéma optimalizace průběhu amplifikace

Před samotnou optimalizací bylo nutné každý z páru primerů rozředit, jelikož byly výrobcem dodány v lyofilizovaném stavu. Pro přípravu zásobního roztoku primerů jsme zvolili rozředění primerů v koncentraci 20 μ M (jedno z doporučených ředění výrobcem) a z tohoto zásobního roztoku byl dále připravován čerstvý roztok primerů v koncentraci dle výsledku optimalizace. Každý pár primerů byl testován rozředěním v ředící řadě 1:4, 1:2, 1:1 a jako neředěný primer. Zásobní roztok byl ředěn dH₂O. Výsledné ředění každého primeru je uvedeno v kapitole Výsledky.

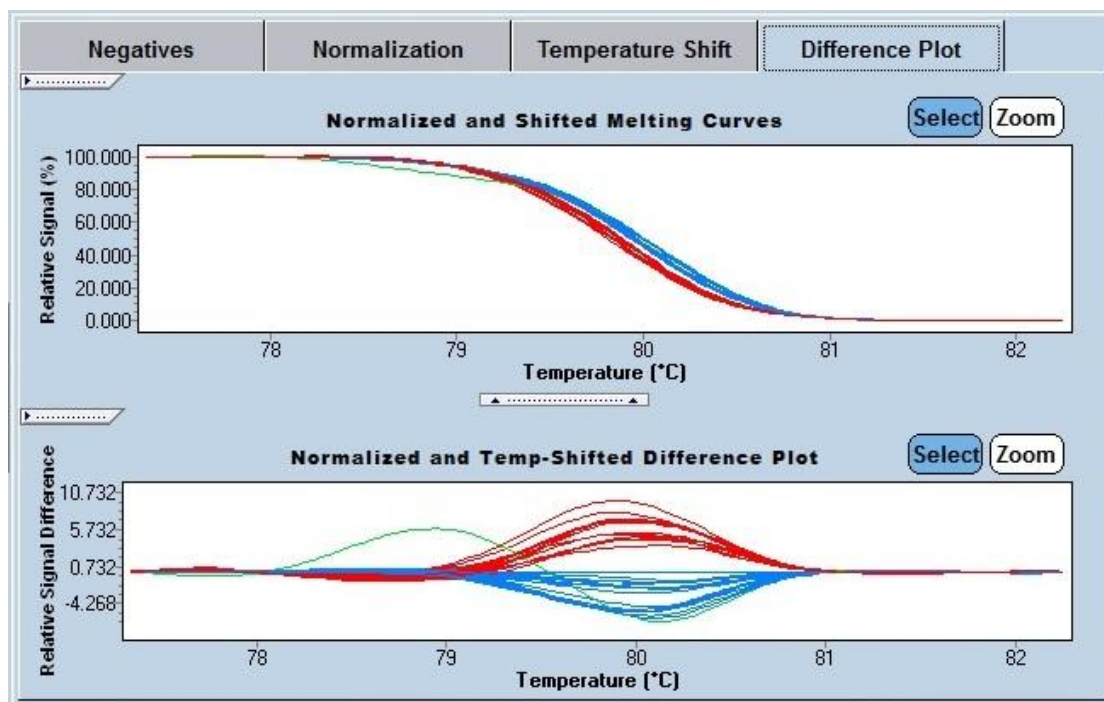
Dalším bodem optimalizace průběhu amplifikace bylo zjištění optimální teploty nasedání primerů. Teplota nasedání primerů byla testována v rozmezí teplot od 55°C do 65°C. Optimální teplota každého z primerů je uvedena v kapitole Výsledky.

Výsledky analýzy vzorků byly hodnoceny v analyzačním softwaru LightCycler® 480 Software Release 1.5.0., v programu Gene Scanning a T_m calling.

Program LightCycler[®] 480 Gene Scanning Software je analyzačním programem přímo určeným ke zhodnocení výsledků analytické metody HRM. V prvním kroku analýzy provede program normalizaci hrubých dat za porovnání iniciační a finální fluorescence všech vzorků, tak aby křivky byly uniformní a mohly se dále porovnávat. V dalším kroku (temperature shift) program seřadí normalizované křivky podle bodu, ve kterém byly zcela denaturovány. Posledním krokem je převedení takto upravených dat v diferenční křivku (difference plot), kdy se vůči referenčnímu vzorku, respektive křivce tání (zde označena jako „base curve“), porovnává průběh tání ostatních vzorků. Díky tomu jsou vzorky rozděleny na základě svých křivek tání. Protože program srovnává vzorky vůči označeným standardům – v tomto případě vůči dvěma možným variantám nukleotidů dané SNP pozice (přičemž standardy mohou být součástí běhu, popřípadě uloženy externě), výsledkem analýzy je přiřazení označení varianty nukleotidu ke každému vzorku (Obrázek č. 7 a č. 8). Po optimalizaci tohoto softwaru je možné docílit rozlišení nukleotidových variant ve zkoumaném populačním vzorku.

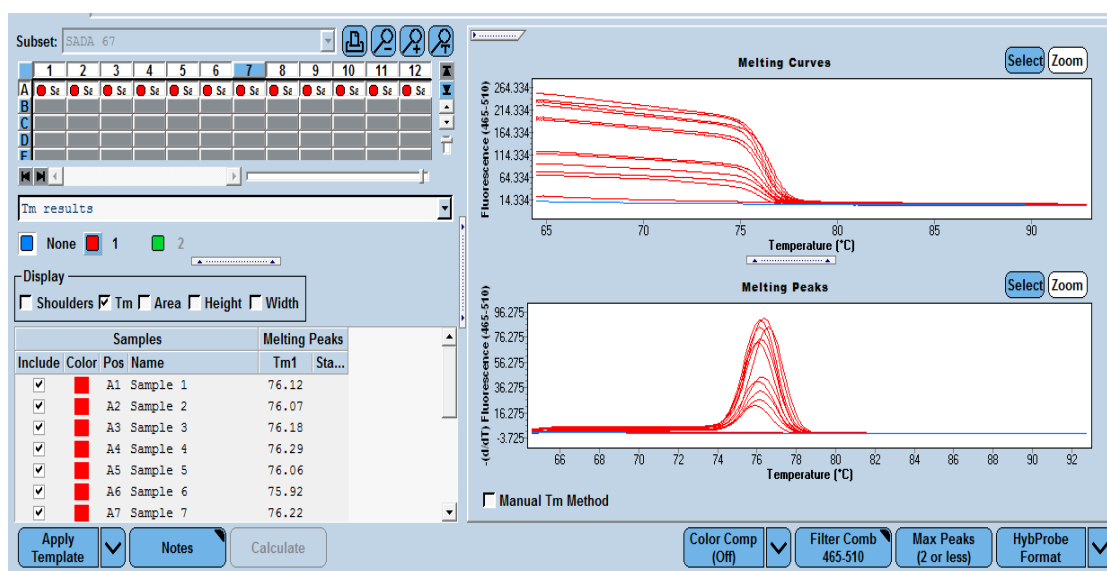


Obrázek č. 7. Analýza 11 vzorků izolátů bukálních stěrů pomocí primerů C7028T, v programu Gene scanning. V tabulce vzorků (v levé části obrázku) je v každém sloupci jeden vzorek, vždy analyzován v tripletu. V pravé horní části je zobrazen průběh tání amplifikátů vzorků a v dolní části normalizovaný průběh tání. Vzorek A1 byl v této analýze označen jako standardní vzorek – nukleotid C (vzorky mající nukleotid C mají v grafu modrou barvu), vzorek A2 byl označen jako standardní vzorek – nukleotid T (vzorky obsahující nukleotid T na dané SNP pozici jsou označeny červenou barvou). Oranžovou barvou jsou označeny negativní vzorky. V přiloženém grafu je znázorněn průběh analýzy.



Obrázek č. 8. Konečné vyhodnocení výsledků je zobrazeno v diferenčním grafu (navazuje na Obrázek č. 8), kdy vůči jednomu vybranému vzorku (v grafu se nachází uprostřed vzorků jakožto rovná čára, označovaná jako „base curve“) jsou porovnány vzorky ostatní v závislosti na rozdílu teploty tání.

Druhým programem, ve kterém probíhala analýza vzorků, je Tm calling. Analýza křivky tání zobrazuje pokles fluorescence na základě tání amplifikátů vzorků v průběhu zvyšující se teploty. Podle křivky tání je též softwarem vytvořen graf pro první zápornou derivaci křivky tání, ve kterém jsou teploty tání vzorků zobrazeny jako píky (Obrázek č. 9). Výsledkem hodnocení tohoto programu je stanovení teploty tání amplifikátů.



Obrázek č. 9. Analýza vzorků v program Tm calling – na levé straně se nachází tabulka s označenými vzorky. V řádku se nachází sada izolátů mtDNA biologického materiálu od jednoho donora, konkrétně A1-3 izolát z bukálního stěru, A4-6 izolát vlasů v anagenní fázi, A7-9 izolát z axilárního ochlupení a A10-12 izolát z pubického ochlupení. Spolu se vzorky se analyzoval negativní vzorek (v grafu označen modrou barvou). Pod souborem vzorků se nachází tabulka zobrazující teploty tání pro každý vzorek, na pravé straně jsou umístěny grafy zobrazující teplotu tání.

Teploty tání získané analýzou vzorků programem Tm calling, spolu s nukleotidovou variantou, byly zaznamenány. Výsledky byly následně vyhodnoceny ve statistickém programu R, verze 2.15.3.

7.3.2.1. Optimalizační krok č. 1

Prvním krokem optimalizace amplifikační reakce bylo zjištění optimální koncentrace a teploty nasedání všech pěti párů primerů. Každý pár primerů byl testován separátně. Destička, do které se pipetovala reakční směs, obsahuje 12 sloupců a 8 řad. Pro toto testování bylo využito termocycleru Verity za využití možnosti nastavení gradientu teplot od 55°C do 65°C, kde pro každé 2 sloupce byla nastavena jiná teplota nasedání primerů. Ředění primerů bylo testováno vždy po dvou řadách v ředící řadě 1:4, 1:2, 1:1 a dále byl

testován neřaděný primer (viz Obrázek č. 10 – Schéma rozdělení 96ti jamkové reakční destičky).

Každé ředění primerů pro každou teplotu tedy bylo testováno po čtyřech vzorcích za užití totožného vzorku DNA extrahovaného od jedné osoby. Pro správný průběh amplifikace je důležité optimální množství Mg^{2+} v reakční směsi (do reakce je pipetováno jakožto $MgCl_2$ o koncentraci 25 mM). Jelikož v úvodní optimalizační reakci bylo možné zkoumat pouze dvě proměnné v reakci, bylo pipetováno 1,8 μl $MgCl_2$ (což je předpokládané optimální množství). Po stanovení teploty annealingu a optimální koncentrace primerů bylo optimalizováno množství hořecnatých iontů v reakci.

	55		57		59		61		63		65	
ředění primerů 1:4												
ředění primerů 1:2												
ředění primerů 1:1												N
neředěný primer												N

Obrázek 10. Schéma rozdělení 96ti jamkové destičky a rozdělení testovaných kombinací teplot tání a ředění primerů. Spolu se vzorky byly testovány 2 negativní vzorky (označeny písmenem N)

Vzorky byly připravovány do 96 jamkové reakční destičky určené do termocycleru Verity. Do každé jamky bylo vždy pipetováno 10 μl HRM Master Mixu, 1 μl forward a 1 μl reverse primeru (ředění dle testovaného řádku), 1,8 μl $MgCl_2$, 5,2 μl dH_2O a 1 μl izolátu DNA.

Nastavení teplotního profilu amplifikační reakce na termocycleru Verity:

- úvodní denaturace: 10 min při 95°C
- amplifikace, 42 cyklů:
 - denaturace 10 s, při 95°C
 - annealing 15 s, při nastavené teplotě (viz Obrázek č. 9)
 - amplifikace 20 s, při 72°C
- ochlazení a uchování vzorků: ∞ při 4°C

Protože termocycler Verity nemá speciální optiku snímající průběh reakce, bylo nutné provést analýzy vzorků metodou HRM na přístroji LightCycler. Tento přístroj analyzuje vzorky na jiném typu destičky, proto bylo nutné vzorky z původní destičky přepipetovat do destičky nové. Aby bylo zajištěno, že u všech vzorků bude analýza provedena ze stejného množství vzorků (rozdílné množství amplifikátů vzorků by mohlo negativně ovlivnit výsledek analýzy), bylo po promíchání vzorků v destičce přeneseno 10 μ l vzorků do destičky k analýze v přístroji LightCycler.

Nastavení teplotního profilu HRM na přístroji LightCycler:

- úvodní denaturace: 10 min při 95°C
- HRM reakce – 1 cyklus
 - 1 min při 95°C
 - 1 min při 40°C
 - 1 s při 65°C při nárůstu (Ramp Rate) 0,02°C/s
 - do 95°C, v průběhu nárůstu teploty kontinuální měření míry fluorescence (Acquistitions per °C) – 25x /1°C
- ochlazení a uchování vzorků: 10 min při 4°C

Hodnocení průběhu reakce zkoumaných vzorků bylo provedeno v programu Tm calling. Ze všech kombinací teplot tání a koncentrace primerů byla vybrána taková kombinace, při které průběh tání amplifikátů dosahoval nejvyšší míry fluorescence v jednotkách RFU (poukazuje na vysoké množství vzniklého amplifikačního produktu), teploty tání čtyř vzorků byly téměř shodné a v průběhu amplifikace nevznikaly nespecifické produkty.

7.3.2.2.Optimalizační krok č. 2

Poté, co byla prvním optimalizačním krokem vybrána optimální teplota annealingu a koncentrace primerů, bylo možné přistoupit k optimalizaci množství Mg^{2+} v reakční směsi. V reakci byla testována ředící řada od 1,4 μ l až 2,4 μ l $MgCl_2$ (ředící řada vzrůstá po 0,2 μ l $MgCl_2$) v celkovém reakčním objemu 20 μ l. K optimalizaci reakce byl použit identický izolát DNA jako při prvním optimalizačním kroku.

Již v tomto kroku byla stanovena optimální teplota annealingu daného SNP primeru, nebylo tedy nutné k amplifikaci produktů využívat cycleru Verity, ale pro amplifikaci a následný průběh HRM se užilo přístroje LightCycler.

Vzorky byly připravovány do 96 jamkové destičky. Do každé jamky bylo vždy pipetováno 10 μ l HRM Master Mixu, 1 μ l forward a 1 μ l reverse primeru (ředění dle optimalizace, viz kapitola Výsledky), 1 μ l izolátu DNA, množství testovaného $MgCl_2$. Reakce byla doplněna takovým množstvím dH_2O , aby celkový objem reakce byl 20 μ l.

Nastavení teplotního profilu amplifikace a HRM na přístroji LightCycler:

- úvodní denaturace: 10 min při 95°C
- amplifikace, 42 cyklů:
 - denaturace 10 s při 95°C
 - annealing 15 s při nastavené teplotě (v závislosti na výsledku Optimalizačního kroku č. 1)
 - amplifikace 20 s při 72°C
- HRM reakce, 1 cyklus
 - 1 min při 95°C
 - 1 min při 40°C
 - 1 s při 65°C při nárůstu (Ramp Rate) 0,02 °C/s
 - do 95°C, v průběhu nárůstu teploty kontinuální měření míry fluorescence (Acquisitions per °C) – 25x /°C
- ochlazení a uchování vzorků: 10 min při 4°C

Jako optimální množství $MgCl_2$ bylo vyhodnoceno takové množství, při kterém průběh tání amplifikátů dosahoval nejvyšší míry fluorescence, píky zobrazující průběh tání opakovaně indikovaly shodnou teplotu tání a průběh reakce nevykazoval vznik nespecifických produktů. Finální množství $MgCl_2$ bylo optimální pro každý z SNP primerů je uvedeno v kapitole Výsledky.

7.3.2.3. Optimalizační krok č. 3

Do optimalizace průběhu reakce bylo též zahrnuto testování vlivu snížené koncentrace vstupního materiálu do amplifikační reakce. Izolovaná DNA bučálního stěru jednoho z dárců byla nejprve kvantifikována. Na základě této kvantifikace byl roztok DNA rozředěn tak, aby se v 1 µl vzorku nacházel 1 ng nDNA. Následně se připravila ředící řada, kdy zásobní roztok DNA byl zředěn 50x, 100x, 500x, 1 000x, 5 000x, 10 000x, 20 000x, 50 000x. Výsledné teploty tání pro každý z SNP primerů jsou k nahlédnutí v kapitole Přílohy – Tabulky č. 1, č. 3, č. 6.

Po zdárné optimalizaci průběhu amplifikační reakce a reakce HRM následovalo ověření na sérii vzorků, zda je možné pomocí vybraných primerů na základě teploty tání rozlišit nukleotidovou variantu na dané pozici SNP. Následně proběhla analýza trichologického materiálu.

7.4. Protokol sekvenace mtDNA

K sekvenaci mtDNA bylo užito standardně užívaného protokolu KUP. Jelikož nebylo z kapacitních důvodů možné osekvenovat pro každý primer všechny analyzované vzorky, varianta nukleotidů daných SNP markerů byla ověřována u následujících vzorků:

- vzorky s teplotou tání na dolní hranici teploty tání dané varianty SNP
- vzorky ve středním pásmu teploty tání dané nukleotidové varianty SNP
- vzorky v horní hranici teploty tání dané varianty SNP
- vzorky, jejichž teplota tání se nalézala v hraniční oblasti mezi předpokládanými teplotami tání dvou nukleotidů dané SNP

Sekvenací takto vybraných vzorků byly potvrzeny teplotní rozmezí pro obě varianty nukleotidu každého SNP. Dále sekvenace umožnila potvrdit vhodnost vybraného úseku k analýze mtDNA, jelikož bylo možné potvrdit, zda se v produktu amplifikovaných úseků mtDNA objevují další pozice (kromě vybrané pozice SNP), kde by docházelo k mutaci a tím i ovlivnění teploty tání amplifikátů primerů (a tím i špatné interpretace výsledků).

7.4.1. Amplifikace

Vzorky byly připravovány do bílé, 96 jamkové destičky určené pro přístroj LightCycler. Do každé jamky bylo vždy pipetováno 12,5 µl SYBER Green I Master Mixu, 1,5 µl forward primer (optimální koncentrace dle optimalizace PCR), 1,5 µl reverse primer (optimální koncentrace dle optimalizace PCR), 8,5 µl dH₂O a 1 µl izolovaného vzorku.

Nastavení teplotního profilu na přístroji LightCycler:

- úvodní denaturace: 10 min při 95°C
- amplifikace, 40 cyklů:
 - denaturace 15 s při 95°C
 - amplifikace 1 min při 60°C
- HRM (melting): od 50°C do 90°C
- ochlazení a uchování vzorků: ∞ při 4°C

7.4.2. Purifikace amplifikátu I

Destička s produkty předchozího kroku byla nejprve po dobu 10 s protřepána na třepačce a dále centrifugována po dobu 2 min při 2000 rpm. V této fázi jsme napipetovali 5 µl amplifikátu do předem připravené 1,5 ml zkumavky uložené do chladicího boxu. K amplifikátu jsme dále přidali 2 µl ExoSAP-IT, který se v průběhu pipetování reagentie do zkumavky uchovával v chladicím boxu.

Při analýze výsledného elektroforetogramu byl zjištěn výskyt artefaktů způsobeného špatným přečištěním amplifikátu a nedostatečným odstraněním primerů, které znemožňovaly osekvenování požadovaného úseku mtDNA. Z tohoto důvodu jsme původní protokol upravili následovně:

- Po smíchání amplifikátu a enzymatické směsi ExoSAP-IT jsme vzorky řádně promísili na třepačce a následně centrifugovali na příruční centrifuze tak, aby se roztok zcela přemístil na dno zkumavky. Protože má směs enzymů velkou hustotu

a v průběhu aktivace enzymatické reakce nedochází ke střídání teplot (díky kterému se směsi reagensů v průběhu reakce promíchávají), pravděpodobně enzymatická reakce neproběhla optimálně. Jelikož promísení i centrifugaci je nutné provést mimo chladicí blok (směs enzymů není možné až do spuštění reakce ponechat v chladu, což může mít nežádoucí vliv na enzymy), je nutné tyto kroky provést v co nejkratším možném čase.

- Původní nastavení průběhu enzymatické reakce bylo 15 min při 37°C následovaných deaktivací enzymů po dobu 30 min při 80°C. Aby byla možná řádná degradace všech nenavázaných primerů a nespotřebovaných dNTP v průběhu reakce, byla enzymatická reakce prodloužena na dobu 30 min při 37°C.

Finální nastavení teplotního profilu na termocycleru ABI9700:

- enzymatická reakce ExoSAP-IT: 30 min při 37°C
- deaktivace enzymatické směsi ExoSAP-IT: 30min při 80°C
- chlazení a uchování: ∞ při teplotě 4°C

7.4.3.Sekvenační reakce

Reakční směs jsme připravili do 96ti jamkové destičky určené na analýzu v termocycleru ABI9700, kdy do každé jamky byl přidán 1 µl sekvenačního kitu, 2 µl sekvenačního pufru, 1 µl jednoho z párů primerů (v optimální koncentraci) a směs dH₂O a vzorku o objemu 6 µl. Jaký poměr vody a vzorku bude užít, se odvozuje od výsledků amplifikační reakce.

Na kvalitě elektroforetogramu se velkou měrou podílí množství užitého amplifikátu. Pokud se v počátku sekvenační reakce nachází příliš velké množství vstupního materiálu, výsledné množství analyzovaných fragmentů je příliš velké. Respektive výsledný signál emitovaný ddNTP skupinou fragmentů totožné délky (stanovující typ nukleotidu na dané pozici), je natolik silný, že analýza sekvence není možná.

Množství amplifikátu z první amplifikační reakce, kterou jsme užili do každé sekvenační reakce, jsme odvodili ze zkušeností předchozích sekvenací mtDNA v laboratoři KUP.

Nejvyšší množství produktů v první amplifikační reakci vykazovaly izoláty z bukálních stěrů, u kterých se hladina fluorescence pohybovala v rozmezí 3500 – 5000 RFU se do sekvenační reakce z počátku užilo 1 μ l vzorku. U vzorků, jejichž fluorescence se pohybovala v rozmezí 1500 – 3500 RFU, se přidávaly 2 μ l vzorku do sekvenační reakce (na této fluorescenční hladině se pohybovala koncentrace mtDNA především u izolátu z trichologického materiálu)

- Optimalizace užití vhodného množství vzorku z amplifikační reakce bylo problematické především u vzorků vyizolovaných z bukálních stěrů, kdy užití 1 μ l vzorku vykazující fluorescenci 4000 RFU se často ukazovalo jako příliš veliké. Užití pouze 0,5 μ l vzorku do sekvenační reakce se ukázalo jako optimální. U trichologického materiálu se osvědčilo užití 2 μ l vzorku při fluorescenci amplifikátu při 1500 – 3500 RFU.

Sekvenace probíhala na termocycleru ABI9700 za užití následujícího teplotního profilu:

- úvodní denaturace: 1 min při 96°C
- sekvenační reakce
 - denaturace: 10 s při 96°C
 - annealing primerů: 5 s při optimální teplotě užitého primeru
 - amplifikace: 4 min při 60°C
- ochlazení a uchování: ∞ při 4°C

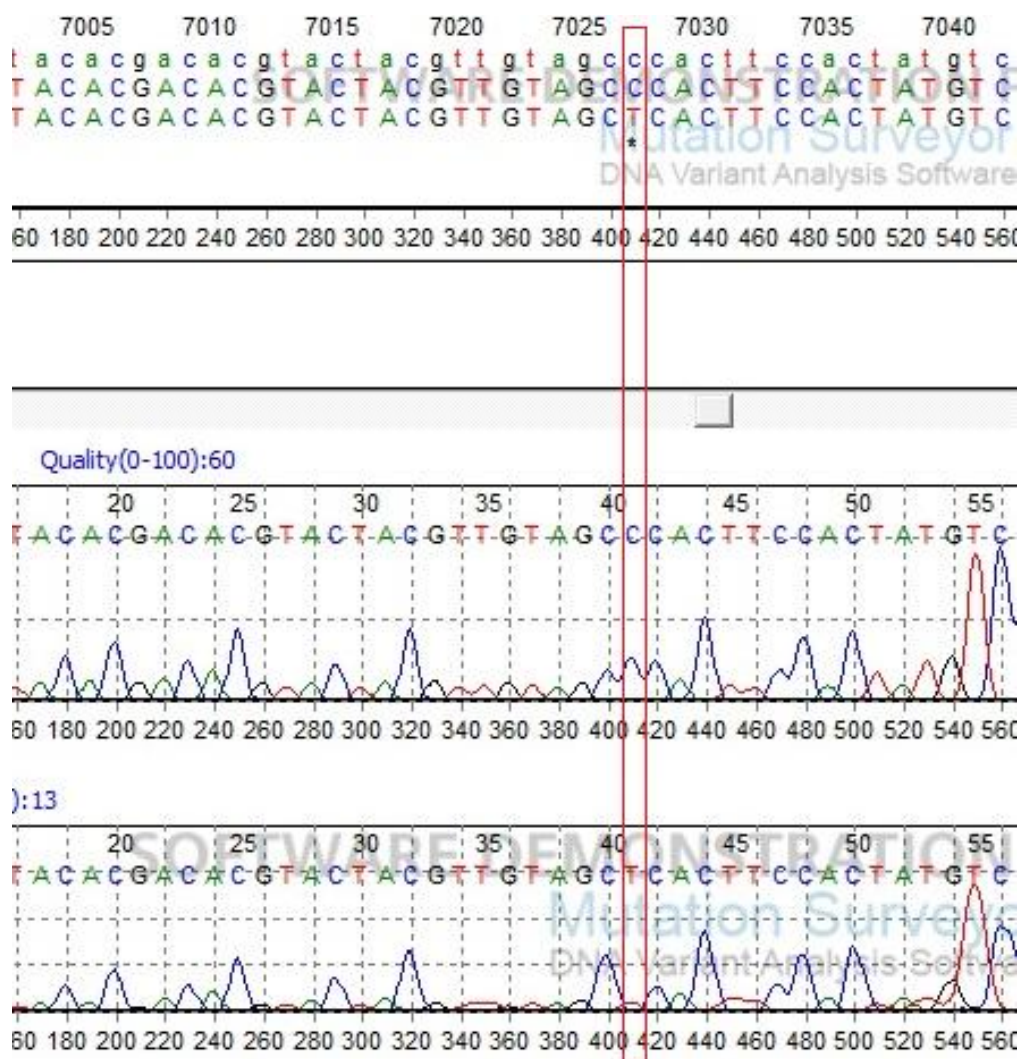
7.4.4. Purifikace amplifikátu II

K přečištění bylo užito kitu BigDye XTerminator a tyto reagenty byly přidány přímo do reakční směsi z předchozí reakce (vzorky byly ponechány v původní 96ti jamkové destičce). Do každé jamky s 10 μ l reakční směsi bylo přidáno 45 μ l SAM™ Solution a 10 μ l XTerminator™ Solution (obojí z kitu BigDye XTerminator). Takto připravená směs byla inkubována po dobu 30 minut za stálého třepání na rotační třepačce a následně centrifugována na velké centrifuze po dobu 2 min při 2000 rpm. Jelikož se po tomto kroku nespotřebované ionty a primery nacházely na dně jamky a DNA byla rozptýlená v supernatantu, bylo možné přikročit k analýze vzorků na kapilární elektroforéze.

7.4.5. Stanovení sekvence mtDNA

Sekvence mtDNA byla stanovena za užití přístroje pro kapilární elektroforézu – sekvenátoru. Před vložením destičky do sekvenátoru byla destička fixována do speciální ochranné podložky. Jamky byly překryty gumovou fólií spolu s pevnou deskou s otvory nad jamkami, tato ochrana sloužila ke stabilizaci jehly kapiláry. Napětí při nástřiku sekvenátoru bylo 3kV po dobu 10 s.

K vyhodnocení elektroforetogramů získaných sekvenací jsme použili software Mutation Surveyor verze V4.0.8. (SoftGenetics LLC). Porovnání sekvence amplifikačních produktů bylo prováděno vůči sekvenci rCRS. Detail vyhodnocení elektroforetogramu je zobrazen jako Obrázek č. 11.



Obrázek č. 11. Vyhodnocení elektroforetogramu v programu Mutation Surveyor. Tento elektroforetogram zobrazuje analýzu vzorku bukálního stěru označeného kódem vz 30, který byl amplifikován párem primerů C7028T. V horní části obrázku jsou pod sebou tři řádky sekvencí. Prvý řádek zobrazuje sekvenci lemující pozici C7028T převzatou z rCRS, druhý řádek uvádí sekvenci patřící k prostřednímu grafu zobrazující ideální průběh sekvenace úseků mtDNA o této sekvenci. Třetí řádek uvádí sekvenci námi analyzovaného vzorku, grafické zobrazení elektroforetogramu amplifikátu vzorku je zobrazeno v dolní části obrázku. V červeném rámečku je zvýrazněna analýza pozice C7028T, tato pozice je v horní části obrázku v řádce se sekvencemi nukleotidů označena hvězdičkou značící mutaci na dané pozici. Porovnáním sekvence amplifikátu vzorku vz 30 se sekvencí převzatou z rCRS je patrné, že se sekvence liší pouze v námi analyzované SNP C7028T.

7.5. Statistické zpracování dat

Naměřené hodnoty teplot tání testovaných vzorků, a to separátně pro každou analyzovanou pozici SNP, byly zaznamenány do přehledné tabulky spolu s výsledky sekvenace (data nejsou uvedena). Po analýze všech vzorků bylo provedeno statistické zpracování dat, a to ve statistickém programu R verze 2.15.3. za užití připraveného skriptu.

Užité statistické výstupy a metody (dle Zvára 2008) jsou tyto:

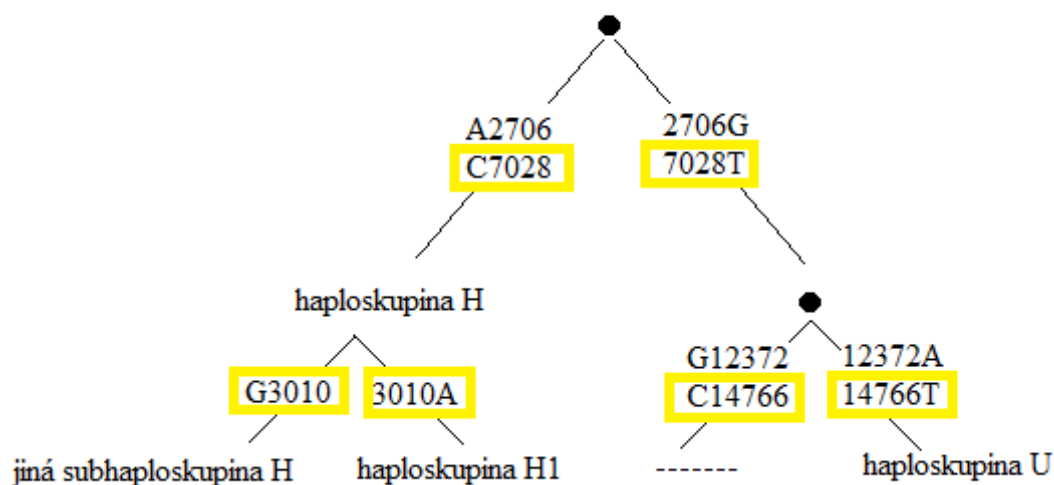
- **Přehled popisných charakteristik.** Pro analyzované markery SNP byl připraven přehled popisných statistik, a to pro každou nukleotidovou variantu zvlášť. V přehledu je vždy uvedena průměrná teplota tání dané nukleotidové varianty, směrodatná odchylka, medián teplot tání, minimální teplota tání, maximální teplota tání, rozsah teplot tání nukleotidové varianty, dolní kvartil (25% hodnot) a horní kvartil (75% hodnot)
- **Krabicový diagram – boxplot.** Krabicový diagram je jedním z typů grafického znázornění popisných charakteristik umožňující srovnání rozložení četností v několika skupinách. Základ grafu tvoří obdélník (box), jehož spodní hrana odpovídá dolnímu kvartilu, horní hrana pak hornímu kvartilu. Medián pak soubor seřazených hodnot rozděluje na dvě stejně velké části.
- **Histogram.** Histogram graficky znázorňuje četnosti hodnot spojité veličiny, přičemž tyto hodnoty jsou rozděleny do intervalů. Z početního zastoupení v jednotlivých intervalech je možné vyvodit, zda soubor dat odpovídá Gaussovu normálnímu rozdělení, což je důležitý poznatek pro další statistické hodnocení, obzvlášť pro rozhodnutí, zda data budou analyzována pomocí parametrických či neparametrických metod.
- **Korelační koeficient.** Za pomoci korelačního koeficientu je možné vyjádřit míru těsnosti lineárního vztahu vynesáním proměnných do grafu, kde lineární vztah je odrazem odchylek bodů od přímky závislosti. Korelační koeficient nabývá hodnot -1 až +1. Hodnota korelačního koeficientu $r=0,1$ značí malou korelační vazbu, $r=0,3$ značí středně silnou korelaci a hodnoty $r=0,5$ jsou hodnoceny jako silná korelační vazba.
- **Graf normálního rozdělení Q-Q.** Za pomoci tohoto grafu se ověřuje, zda soubor dat odpovídá Gaussovu normálnímu rozdělení. Přítomnost odlehlých hodnot

poukazuje v případě dalších statistických hodnocení na nutnost užití neparametrických testů.

- **Wilcoxonův párový neparametrický test.** Za pomoci tohoto testu je možné statisticky porovnat a hodnotit mediány pozorování 2 různých skupin měření v případě, že rozložení měřených dat neodpovídá Gaussovu normálnímu rozdělení. Po provedení statistického testu je určena hodnota p , která se porovnává se zvolenou hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. P hodnotu lze popsat jako pravděpodobnost získání stejné nebo více extrémní hodnoty testové statistiky za předpokladu, že platí nulová hypotéza. V případě, že p hodnota je vyšší než hodnota α , není možné nulovou hypotézu zamítnout. Pokud je naopak p hodnota nižší než hodnota α , nulová hypotéza se zamítá.
- **Robustnost metody.** Robustnost metody je definována jako míra netečnosti či kapacity metody vůči mírným odchylkám či nepatrně změněným podmínkám (například teplotě, koncentraci či době extrakci).
- **Senzitivita testu.** Pomocí senzitivity se stanovuje citlivost testu a vyjadřuje úspěšnost, s níž je zachycena přítomnost sledovaného stavu (nukleotidové varianty) v daném souboru.
Vzorec výpočtu senzitivity se vypočítá podílem počtu skutečně pozitivních (určité nukleotidové varianty) ku součtu počtu skutečně pozitivních a falešně negativních stanovení
- **Specificita testu.** Za pomoci specificity se vyjadřuje schopnost testu vybrat případy, u nichž zkoumaný znak (nukleotidová varianta) nenastává.
Specificita testu se stanovuje jakožto podíl počtu skutečně negativních případů ku součtu počtu skutečně negativních a falešně pozitivních stanovení.

8. VÝSLEDKY

Analýza výsledných teplot tání zkoumaných vzorků byla provedena v programu Gene Scanning a Tm calling. teploty tání amplifikátů vzorků spolu se stanovenou nukleotidovou variantou byly zaznamenány do skórovací tabulky (formát dat nutný pro zpracování ve statistickém programu R) a následně byly výsledky statisticky vyhodnoceny. Na obrázku č. 12 je zvýrazněno, u kterých SNP markerů se podařilo optimalizovat genotypizaci. Detailní popis výsledků optimalizace jednotlivých markerů je blíže popsán dále v textu.



Obrázek č. 12. Stromový diagram analyzovaných SNP markerů. Žlutě jsou zvýrazněny ty SNP markery, u nichž se podařila optimalizace genotypizace.

8.1. Výsledky optimalizace amplifikace primeru G3010A a následné HRM analýzy

Jelikož se průběh amplifikační reakce páru primerů k SNP G3010A převzatého z publikace Brandstätter et al (2003) (sekvence uvedena v Tabulce č. 2) nepodařilo optimalizovat, byl tento pár primerů vyhodnocen jako nevhodný pro analýzu amplifikátů metodou HRM. Kvůli absenci produktů amplifikační reakce byla analýza prohlášena za negativní.

Z tohoto důvodu se přikročilo k optimalizaci nově navržených primerů k analýze SNP G3010A (sekvence uvedena v Tabulce č. 3).

Na SNP pozici G3010A mtDNA se vyskytuje dle rCRS nukleotid G nebo záměna nukleotidem A. Po optimalizaci amplifikační reakce a průběhu HRM byla testována série 25 vzorků bukalních stěrů získaných od dobrovolníků (viz kapitola Materiál). Díky tomu se ověřilo, zda je možné produkty amplifikace rozdělit dle teploty tání v závislosti na variantě nukleotidu dané pozice. Byla stanovena zóna překryvu teplot tání, ve které se vyskytovaly vzorky jak s alelou G, tak alelou A. Tato zóna byla stanovena mezi teplotami 80,9°C a 81,0°C. Vzorky spadající opakovaným testováním do této zóny je vhodné podstoupit další analýze, například sekvenaci, jinak hrozí špatné označení nukleotidové varianty daného vzorku.

Výsledky optimalizace průběhu amplifikační reakce pro tento pár primerů jsou:

- optimální teplota nasedání primerů je při 57°C (viz Obrázek č. 9)
- optimální koncentrace primerů v reakci je 0,35 µM (rozředěno z 20 µM zásobního roztoku primerů v poměru 1:2 dH₂O)
- optimální koncentrace Mg²⁺ v reakci byla stanovena na 2,5 mM (do reakce se přidávaly 2 µl MgCl₂ o koncentraci 25 mM)
- teplotní rozmezí původního nukleotidu G na pozici 3010 bylo stanoveno v rozmezí teplot 81,02°C – 81,52°C
- teplotní rozmezí polymorfního nukleotidu A na pozici 3010 bylo stanoveno mezi teplotami 80,5°C – 80,88°C

Tato optima byla stanovena na základě opakovaného testování, kdy jednotlivé vzorky byly analyzovány v dublech.

Tabulka č. 4. zobrazuje souhrn popisných charakteristik distribuce teplot tání nukleotidových variant A a G SNP markeru G3010A. Na základě těchto statistických dat bylo stanoveno teplotní rozmezí pro každou nukleotidovou variantu SNP markeru.

Tabulka č. 4. Tabulka popisných charakteristik distribuce teplot tání nukleotidů A a G amplifikátů primerů SNP G3010A.

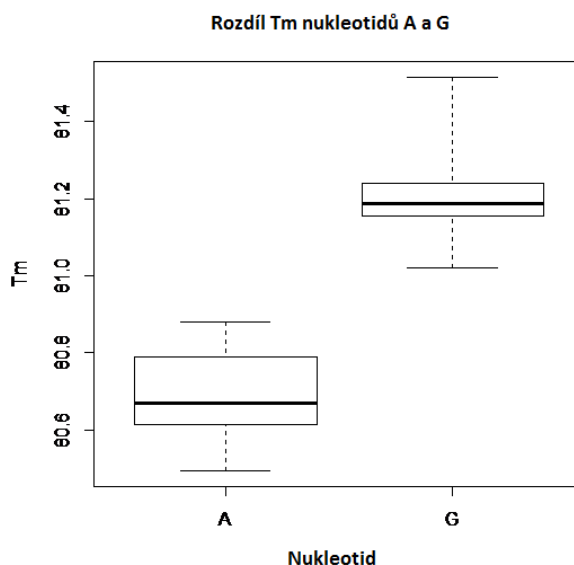
	Průměr	Sm. Odch.	Median	Minimum	Maximum	Rozsah	Dol. Kvart.	Hor. Kvart.
T _m prům.A	80,69	0,14	80,67	80,5	80,88	0,38	80,61	80,79
T _m prům.G	81,2	0,13	81,19	81,02	81,52	0,5	81,16	81,24

T_m prům. nukleotidu – průměr teplot tání ze dvou nebo tří měření, Sm. odch. – směrodatná odchylka, Dol. kvartil – 25% vzorků, Hor. kvartil – 75% vzorků.

Do optimalizace amplifikační reakce bylo zahrnuto testování vlivu snížení koncentrace vstupního materiálu (pomocí ředící řady) na teplotu tání amplifikátů, čímž se testovala robustnost reakce. Toto bylo testováno z důvodu předpokládaného nízkého obsahu mtDNA v reálných vzorcích. Tabulka s přehledem teploty tání amplifikátů ředící řady vzorků je přiložena v kapitole Přílohy: Tabulky, pod označením Tabulka č. 1. Nebyl pozorován vliv snížené koncentrace mtDNA ve vzorcích na teplotu tání.

Při optimalizaci tohoto páru primerů nebylo možné z technických důvodů sekvenací ověřit příslušné nukleotidové varianty.

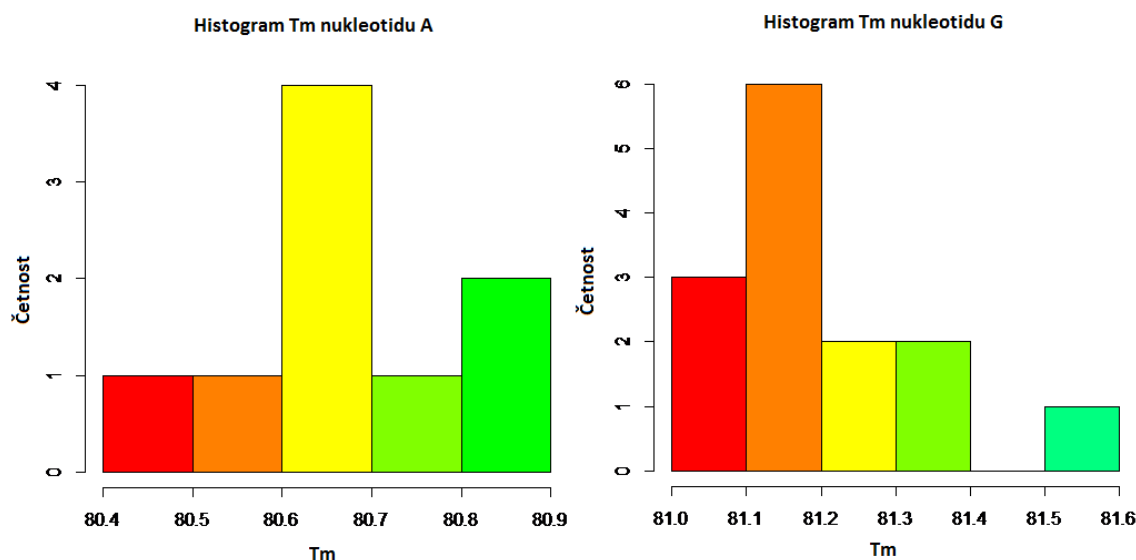
Část popisných charakteristik distribuce teplot tání nukleotidových variant G3010A je graficky znázorněna pomocí krabicového diagramu v Grafu č. 1. Je dobře patrný rozdíl v teplotách tání amplifikátů jednotlivých nukleotidů, rozdíl v mediánu i průměrné teplotě tání činí 0,5°C.



Graf č. 1. Distribuce teplot tání nukleotidů A a G amplifikátů primerů SNP G3010A separovaných z bukálních stěrů.

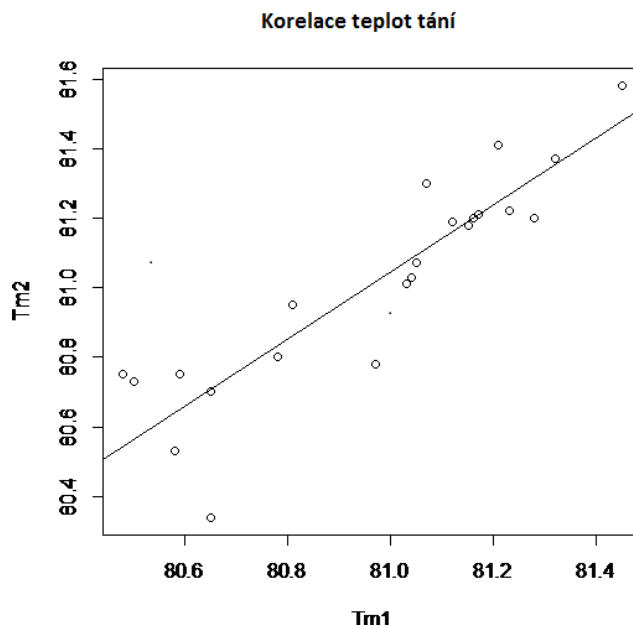
Histogramy distribuce teplot tání pro nukleotidy A a G jsou přiloženy v Grafu č. 2.

Z histogramů je patrné, že soubory teplot tání obou nukleotidových variant SNP markeru neodpovídají Gaussovu normálnímu rozdělení. Toto bylo potvrzeno i pomocí grafu normálního rozdělení Q-Q (graf není uveden), kde nejvíce odlehlých hodnot bylo v oblasti mediánu teplot tání nukleotidu G. Z tohoto důvodu byl pro další statistické hodnocení zvolen párový neparametrický Wilcoxonův test.



Graf č. 2. Histogramy distribuce teplot tání nukleotidů A a G amplifikátů primerů SNP G3010A ve vzorcích izolovaných z bukálních stěrů.

Dále byla zkontrolována korelace teplot tání všech užitých vzorků mtDNA vyizolovaných z bukálních stěrů, které byly analyzovány v duplikátech. Korelace mezi Tm1 a Tm2 duplikátů činí 0,90, což značí silnou korelační vazbu (viz Graf č. 3).



Graf č 3. Korelace teplot tání vzorků amplifikátů primerů SNP G3010A separovaných z bukálních stěrů.

Tabulka s přehledem průměrných teplot tání amplifikátů jednotlivých sad vzorků trichologického materiálu v anagenní fázi je přiložena v kapitole Příloha: Tabulky, označeno Tabulka č. 2. Celkem bylo užito trichologických sad od sedmi jedinců.

Užitím párového neparametrického Wilcoxonova testu byly porovnány výsledky analýzy DNA vyizolované z různých biologických materiálů u stejné skupiny osob.

Výsledky analýzy párovým neparametrickým Wilcoxonovým testem jsou uvedeny v Tabulce č. 5, hladina významnosti byla zvolena 0,05. Porovnání všech skupin mezi sebou neodhalilo statisticky významné rozdíly.

Tabulka č. 5. Výsledky porovnání párovým neparametrickým Wilcoxonovým testem.

	B-V	B-A	B-P	V-A	V-P	A-P
Hodnota testu	1	9	8	17	16	12
p-hodnota	0,05917	0,8438	0,6875	0,2188	0,3125	0,3125

Mezi sebou byly porovnány teploty tání amplifikátů vzorků všech typů biologického materiálu, pro primery G3010A. Testovaný trichologický materiál byl v anagenní fázi. B-V porovnání bukálních stěrů a vlasů, B-A porovnání bukálních stěrů a axilárního ochlupení, B-P porovnání bukálních stěrů a pubického ochlupení, V-A porovnání vlasů a axilárního ochlupení, V-P porovnání vlasů a pubického ochlupení, A-P porovnání axilárního a pubického ochlupení.

Námi položená nulová hypotéza (H_0) říká, že teplota tání mtDNA vyizolovaná z různého typu biologického materiálu jedinců se neliší. Jelikož se nulovou hypotézu nepodařilo zamítnout, platí, že teplota tání amplifikátů (a tudíž i varianta nukleotidu SNP G3010A) mtDNA vyizolované z bukálního stěru, vlasů, axilárního a pubického ochlupení v anagenní fázi se u jedinců statisticky významně neliší.

8.2. Výsledky optimalizace amplifikace primeru C7028T a následné HRM analýzy

Podobně jako u předešlého páru primerů, ani průběh amplifikační reakce páru primerů k SNP C7028T převzatých z publikace Brandstätter et al (2003) (viz Tabulka č. 2) se nepodařilo optimalizovat. Proto byl tento pár primerů zhodnocen jako nevhodný pro analýzu amplifikátů metodou HRM a z důvodu absence produktů amplifikační reakce byla analýza SNP C7028T prohlášena za negativní.

Z toho důvodu se přikročilo k optimalizaci nově navrženého páru primerů k analýze SNP C7028T (viz Tabulka č. 3).

Na pozici C7028T mtDNA se vyskytuje dle rCRS nukleotid C nebo záměna nukleotidem T. Po optimalizaci amplifikační reakce a průběhu HRM byla testována série 43 vzorků bukálních stěrů získaných od dobrovolníků (viz kapitola Materiál). Testováním této série

vzorků byla ověřena možnost rozdělení produktů amplifikace dle teploty tání v závislosti na variantě nukleotidu na této SNP pozici. Zóna překryvu teplot tání nukleotidů C a T byla stanovena v rozmezí 79,8°C – 79,9°C.

Výsledky optimalizace průběhu amplifikační reakce pro tento pár primerů jsou:

- optimální teplota nasedání primerů je při 59°C (viz Tabulka č. 9)
- optimální koncentrace primerů v reakci je 0,2 μM (rozředěno z 20 μM zásobního roztoku primerů v poměru 1:4 dH₂O)
- optimální koncentrace Mg²⁺ byla stanovena na 2,75 mM v reakci (do reakce se přidávaly 2,2 μl MgCl₂ ze zásobního roztoku o koncentraci 25 mM)
- teplotní rozmezí původního nukleotidu C na pozici 7028 bylo stanoveno v rozmezí teplot 79,91°C – 80,42°C
- teplotní rozmezí polymorfního nukleotidu T na pozici 7028 bylo stanoveno mezi teplotami 79,48°C – 80,05°C

Výše uvedená optima byla stanovena na základě opakovaného testování, kdy jednotlivé vzorky byly testovány v dubletech či tripletech.

Tabulka popisných statistik distribuce teplot tání amplifikátů obsahující nukleotidy C a T je zobrazena v Tabulce č. 6. Tato data byla základem pro stanovení teplotního rozmezí obou nukleotidových variant SNP markeru C7028T

Tabulka č. 6. Tabulka popisných charakteristik distribuce teplot tání nukleotidů C a T amplifikátů primerů SNP C7028T

	Průměr	Sm. Odch.	Median	Minimum	Maximum	Rozsah	Dol. Kvart.	Hor. Kvart.
T _m prům.C	80,12	0,14	80,11	79,91	80,42	0,52	80,01	80,17
T _m prům.T	79,68	0,16	79,66	79,48	80,05	0,56	79,57	79,69

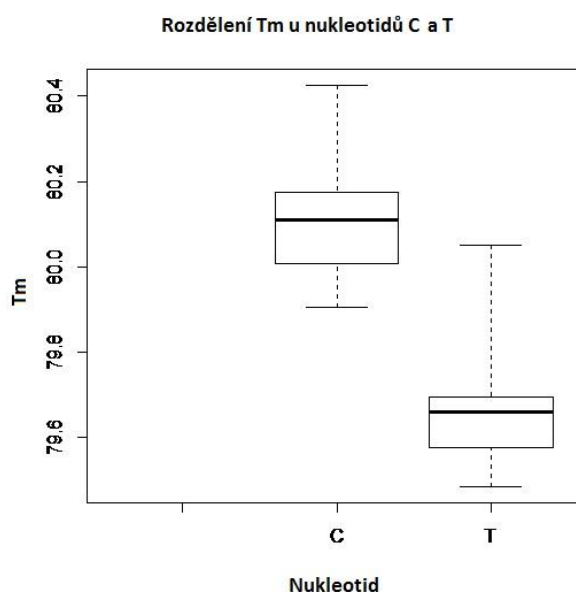
T_m prům. nukleotidu- průměr teplot tání ze dvou nebo tří měření, Sm. odch. – směrodatná odchylka, Dol. kvart. – dolní kvartil, 25% vzorků, Hor. kvart. – horní kvartil, 75% vzorků

Robustnost metody se ověřovala tím, že do optimalizace amplifikační reakce bylo zahrnuto testování vlivu snížení koncentrace vstupního materiálu na teplotu tání amplifikátu. Tabulka s přehledem teplot tání ředící řady vzorků je přiložena v kapitole Přílohy:

Tabulky, pod označením Tabulka č. 3. Nebyl prokázán vliv koncentrace vstupního množství DNA na teplotu tání.

Vybrané vzorky byly osekvenovány, aby se ověřila varianta nukleotidu na dané pozici. V námi sekvenovaných vzorcích nebyly odhaleny další pozice, které by podléhaly mutaci a tím ovlivnily teplotu tání.

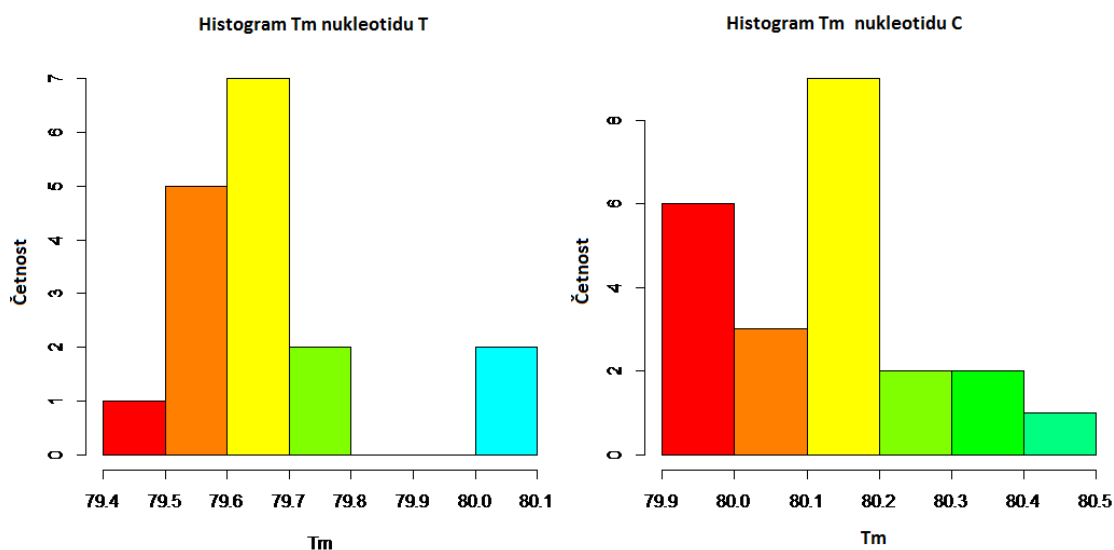
Znázornění rozdělení teplot tání amplifikátů obsahující nukleotidy C a T markeru C7028T je zobrazeno v krabicovém diagramu v Grafu č. 4. Rozdíl v teplotách tání amplifikátů nukleotidových variant markeru činí v mediánu i průměrné teplotě tání 0,44°C. Na diagramu rozdělení teplot tání nukleotidu T je zřetelné, že některé vzorky svou teplotou tání amplifikátů přesahují do teplotního pásma amplifikátů nesoucí nukleotid C.



Graf č. 4. Distribuce teplot tání nukleotidu C a T amplifikátů primerů C7028T, separováno z bukálních stěrů.

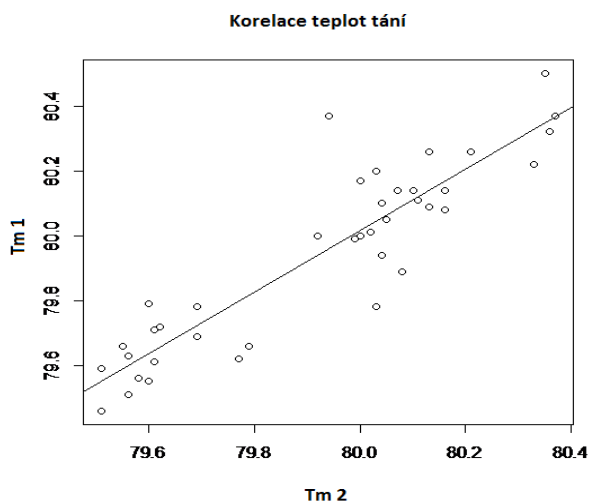
Histogramy distribuce teploty tání amplifikátů nukleotidů T a C jsou přiloženy v Grafu č. 5. Z tvaru histogramů je zřejmé, že soubory teplot tání nukleotidových variant SNP markeru nemají Gaussovo normální rozložení. Toto bylo testováno i pomocí grafu normálního rozdělení Q-Q (graf není uveden), nejvíce odlehlých hodnot teplot tání se nacházelo v oblasti mediánu teplot tání amplifikátů nesoucí nukleotid C. Z tohoto důvodu

byl opět ke statistickému porovnání teplot tání u různých vzorků zvolen párový neparametrický Wilcoxonův test.



Graf č. 5. Histogramy distribuce teplot tání nukleotidů T a C amplifikátů primerů SNP C7028T ve vzorcích izolovaných z bukálních stěrů

Dále bylo stanovena korelace teplot tání izolátů bukálních stěrů, které byly analyzovány v duplikátech. Korelace mezi Tm1 a Tm2 duplikátů činí 0,905, což opětovně značí silnou korelační vazbu (viz Graf č.6).



Graf č. 6. Korelace vzorků mezi Tm1 a Tm2 aplikátů primerů SNP C7028T.

Tabulka s přehledem teplot tání jednotlivých sad vzorků trichologického materiálu v anagenní fázi je přiložena v kapitole Přílohy: Tabulky, označena jako Tabulka č. 4.

Výsledky analyzování párovým neparametrickým Wilcoxonovým testem, kde hladina významnosti byla zvolena 0,05, jsou v tabulce č. 7. Porovnání všech skupin mezi sebou neodhalilo statisticky významné rozdíly.

Tabulka č. 7. Výsledky porovnání párovým neparametrickým Wilcoxonovým testem

	B-V	B-A	B-P	V-A	V-P	A-P
Hodnota testu	19,5	24,5	27	33	29	32
p-hodnota	0,444	0,8558	1	0,625	0,9219	0,6953

Mezi sebou byly porovnány teploty tání amplifikátů vzorků všech typů biologického materiálu, pro primery C7028T. Testovaný trichologický materiál byl v anagenní fázi. B-V porovnání bukálních stěrů a vlasů, B-A porovnání bukálních stěrů a axilárního ochlupení, B-P porovnání bukálních stěrů a pubického ochlupení, V-A porovnání vlasů a axilárního ochlupení, V-P porovnání vlasů a pubického ochlupení, A-P porovnání axilárního a pubického ochlupení.

Námi položená nulová hypotéza (H_0) říká, že teplota tání mtDNA vyizolovaná z různého typu biologického materiálu jedinců se neliší. Jelikož se nulovou hypotézu nepodařilo zamítnout, platí, že teplota tání amplifikátů (a tudíž i varianta nukleotidu SNP C7028T) mtDNA vyizolované z bukálního stěru, vlasů, axilárního a pubického ochlupení v anagenní fázi se u jedinců statisticky významně neliší.

Tabulka s přehledem teplot tání sad trichologického materiálu v telogenní fázi je přiložena v kapitole Přílohy: Tabulky, pod označení Přílohy – Tabulka č. 5.

Dále byla provedena analýza párovým neparametrickým Wilcoxonovým testem, kdy se porovnávala teplota tání amplifikátů vyizolovaných ze vzorků bukálních stěrů a vlasů v telogenní fázi. Hladina významnosti byla zvolena 0,05. Hodnota testu byla 55, p-hodnota 0,001953. Výsledek analýzy tedy zamítá H_0 , což znamená, že teplota tání amplifikátů (a tudíž i varianta nukleotidu SNP C7028T) mtDNA vyizolované z bukálního stěru a vlasů v telogenní fázi se u jedinců liší.

8.3. Výsledky optimalizace amplifikace primeru C14766T a následné HRM analýzy

Jelikož se průběh amplifikační reakce páru primerů k SNP C14766T převzatých z publikace Brandstätter et al (2003) (viz Tabulka č. 2) nepodařilo optimalizovat, byl tento pár primerů zhodnocen jako nevhodný pro analýzu amplifikátů metodou HRM. Analýza byla prohlášena za negativní z důvodu absence produktů amplifikační reakce.

Z toho důvodu se přikročilo k optimalizaci nově navržených primerů k analýze SNP C14766T (viz Tabulka č. 3)

Na pozici 14766 mitochondriální DNA se vyskytuje dle rCRS nukleotid C nebo záměna nukleotidem T. Po optimalizaci amplifikační reakce a průběhu HRM byla testována série 47 vzorků bukalních stěrů získaných od dobrovolníků. Díky testování se ověřilo, zda je možné produkty amplifikace rozdělit dle teploty tání v závislosti na variantě nukleotidu na SNP C14766T. Zóna překryvu teplot tání amplifikátů obsahující nukleotidy C a T byla stanovena v rozmezí 75,8°C – 76,0°C.

Výsledky optimalizace průběhu amplifikační reakce pro tento pár primerů jsou:

- optimální teplota nasedání primerů je při 59°C
- optimální koncentrace primerů v reakci 0,35 µM (rozředěno ze zásobního roztoku primerů v poměru 1:2 dH₂O)
- optimální koncentrace Mg²⁺ byla stanovena na 2,5 mM (do reakce se přidávaly 2 µl MgCl₂ ze zásobního roztoku o koncentraci 25 mM)
- teplotní rozmezí nukleotidu C na pozici 14766 bylo stanoveno v rozmezí teplot 76,05°C – 76,73°C
- teplotní rozmezí polymorfního nukleotidu T na pozici 14766 bylo stanoveno mezi teplotami 74,69°C – 75,72°C

Optima byla potvrzena na základě opakovaného testování, jednotlivé vzorky byly testovány dubletu.

Tabulka popisných charakteristik distribuce teplot tání amplifikátů nesoucí nukleotidy C a T je přiložena v Tabulce č. 7. Tyto statistické údaje byly podkladem pro stanovení rozmezí Teplot tání pro každou variantu SNP markeru C14766T.

Tabulka č. 7. Tabulka popisných charakteristik distribuce teplot tání nukleotidů C a T amplifikátů primerů SNP C14766T.

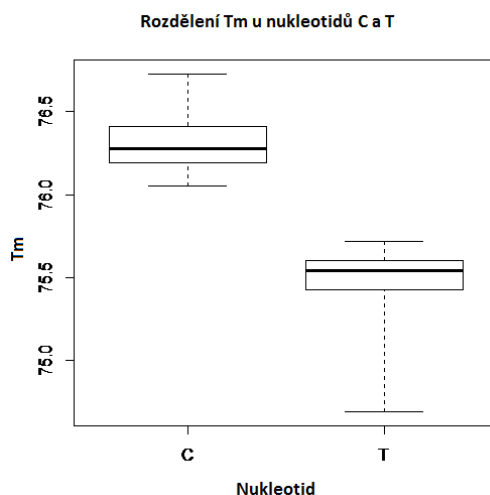
	Průměr	Sm. Odch.	Median	Minimum	Maximum	Rozsah	Dol. Kvart.	Hor. Kvart.
T _m prům.C	76.31	0.19	76.28	76.05	76.73	0.68	76.19	76.41
T _m prům.T	75.48	0.23	75.55	74.69	75.72	1.3	75.43	75.60

T_m prům. nukleotidu- průměr teplot tání ze dvou nebo tří měření, Sm. odch. – směrodatná odchylka, Dol. kvart. – dolní kvartil, 25% vzorků, Hor. kvart. – horní kvartil, 75% vzorků

Vybrané vzorky byly osekvenovány, aby se ověřila varianta nukleotidu na pozici C14766T. V námi sekvenovaných vzorcích nebyly odhaleny další pozice, které by podléhaly mutaci a tím ovlivnily teplotu tání.

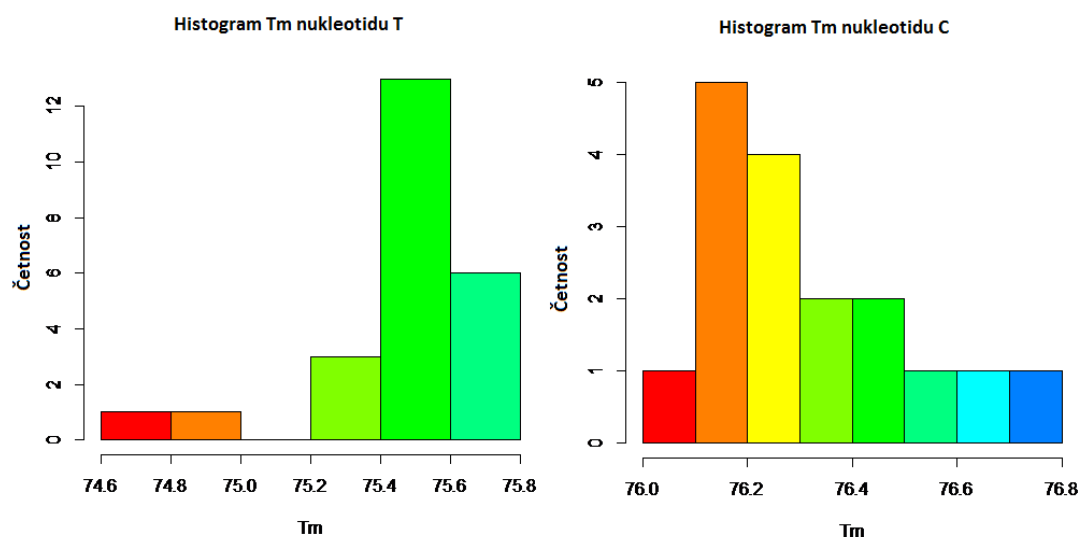
Robustnost reakce byla opětovně testována snížením koncentrace vstupního materiálu DNA do amplifikační reakce. Tabulka s přehledem Teplot tání amplifikátů vzorků ředící řady je přiložena v kapitole Přílohy – Tabulky jako Tabulka č. 6. Neprokázal se vliv snížené koncentrace mtDNA v testovaných vzorcích na teplotu tání amplifikátů primerů.

Grafické znázornění rozdělení teplot tání pro nukleotidy C a T pro primery SNP pozice 14766 je zobrazeno v Grafu č. 7. V grafu je jasně patrná odlišná průměrná teplota tání každého z nukleotidů. Rozdíl mediánu teplot tání činí 0,73°C (při porovnání průměrné teploty tání činí rozdíl 0,83°C), což odpovídá předpokládanému teplotnímu rozdílu pro SNP markery patřící do 1. SNP třídy.



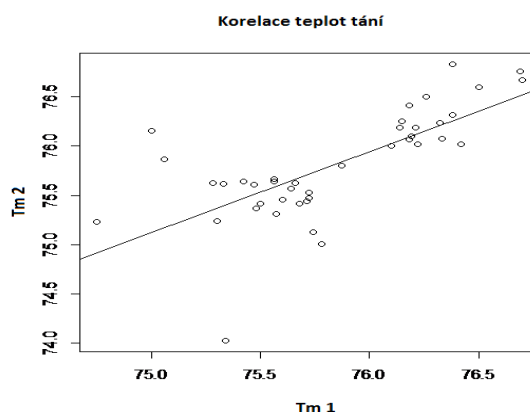
Graf č.7. Distribuce teplot tání nukleotidů C a T amplifikátů primerů SNP C14766T separovaných z bukálních stěrů.

Histogramy distribuce teplot tání amplifikátů nesoucí nukleotid T a C na pozici C14766T jsou přiloženy v Grafu č. 8. Stejně jako v přechozích případech, ani tento soubor analyzovaných dat nevykazuje Gaussovo normální rozdělení (toto bylo ověřeno grafem normálního rozdělení Q-Q). Z tohoto důvodu byl pro další testování a porovnávání různých biologických vzorků použit neparametrický párový Wilcoxonův test.



Graf č. 8. Histogramy distribuce teplot tání amplifikátů nesoucí nukleotidů T a C primerů SNP C14766T ve vzorcích izolovaných z bukálních stěrů.

Dále byla zkontrolována korelace teplot tání amplifikátů užitých vzorků bukálních stěrů, které byly analyzovány v duplikátech. Korelace mezi Tm1 a Tm2 duplikátů činí 0,71, byla tedy opětovně potvrzena silná korelace dat (viz Graf č.9.).



Graf č. 9. Korelace mezi Tm1 a Tm2 aplifikátů primerů SNP C14766T separovaných z bukálních stěrů.

Tabulka s přehledem teplot tání jednotlivých vzorků sad trichologického materiálu v anagenní fázi je přiložena v kapitole Přílohy: Tabulky, uvedeno jako Tabulka č. 7.

Výsledky analýzy párovým neparametrickým Wilcoxonovým testem, kde hladina významnosti byla zvolena 0,05, jsou v Tabulce č. 9. Porovnání všech skupin mezi sebou neodhalilo statisticky významné rozdíly.

Tabulka č. 9. Výsledky porovnání párovým neparametrickým Wilcoxonovým testem-primery SNP C14766T.

	B-V	B-A	B-P	V-A	V-P	A-P
Hodnota test.	22	25	44	23	46	38
p-hodnota	0,625	0,8203	0,1055	1	0,0645	0,0742

Mezi sebou byly porovnány teploty tání amplifikátů vzorků všech typů biologického materiálu. Testovaný trichologický materiál byl v anagenní fázi. B-V porovnání bukálních stěrů a vlasů, B-A porovnání bukálních stěrů a axilárního ochlupení, B-P porovnání bukálních stěrů a pubického ochlupení, V-A porovnání vlasů a axilárního ochlupení, V-P porovnání vlasů a pubického ochlupení, A-P porovnání axilárního a pubického ochlupení.

Námi položená H_0 říká, že teplota tání mtDNA vyizolovaná z různého typu biologického materiálu jedinců se neliší. Jelikož se nulovou hypotézu nepodařilo zamítnout, platí, že teplota tání amplifikátů (a tudíž i varianta nukleotidu SNP C14766T) mtDNA vyizolované z bukálního stěru, vlasů, axilárního a pubického ochlupení v anagenní fázi se u jedinců statisticky významně neliší.

Tabulka s přehledem teplot tání sad trichologického materiálu v telogenní fázi je přiložena v Tabulce č. 8 v kapitole Přílohy: Tabulky.

Byla provedena analýza párovým Wilcoxonovým testem, kdy se porovnávala teplota tání amplifikátů vyizolovaných ze vzorků bukálních stěrů a vlasů v telogenní fázi. Hladina významnosti byla zvolena 0,05. Hodnota testu byla 13, p hodnota byla 0,3008. Výsledek analýzy nevyvrátil H_0 , na základě čehož je možné prohlásit, že se teplota tání amplifikátů (a tím i varianta nukleotidu SNP 14766 mtDNA) mtDNA vyizolované z bukálního stěru a vlasů v telogenní fázi u jedinců neliší.

8.4. Výsledky optimalizace amplifikace primerů A2706G a G12372A a následné HRM analýzy

Amplifikační reakce primerů k SNP pozicím A2706G a G12372A převzaté z publikací (viz Tabulka č. 2) se nepodařila optimalizovat. Z toho důvodu se přikročilo k optimalizaci nově navržených primerů (uvedeny v Tabulce č. 3). Jelikož nebylo možné ani u těchto primerů optimalizovat průběh amplifikační reakce, byly primery vyhodnoceny jako nevhodné pro analýzu vybraných SNP pozic metodou HRM. Analýza těchto SNP pozic byla vyloučena ze studie.

9. DISKUSE

Námi zvolený postup při optimalizaci reakce PCR a následné HRM reakce je srovnatelný s jinými pracemi věnující se optimalizaci a validaci genetické analýzy metodou HRM (van der Stoep et al., 2009). Nabízí se srovnání této studie s prací Norambuena et al. (2009), jelikož bylo užito stejného přístrojového vybavení i velmi podobných reagensů, pouze amplifikační reakce byla optimalizována na poloviční množství použité reakční směsi (10 µl). Tento krok by byl z ekonomického hlediska zajímavým řešením i pro naši studii, avšak jak sami autoři práce přiznávají, neúspěšná analýza některých vzorků byla pravděpodobně způsobena nepřesností v pipetování malého objemu reagensů. Z tohoto důvodu nebylo zahrnuto snížení objemu reakční směsi do našeho protokolu.

Nemalý vliv na optimalizaci průběhu amplifikační reakce a teplotu tání amplifikátu má bezesporu délka a složení primerů, potažmo celého amplikonu. Průměrná délka námi analyzovaných amplifikátů je 90 bp, což je standardní délka amplifikátů v případě analýzy metodou HRM (Brandstätter et al., 2003; Wittwer et al., 2003; Herrmann et al., 2007). Naopak v práci Norambuena et al. (2009) byly analyzovány amplifikáty o průměrné délce 50 bp za dosažení vysoké míry senzitivity a specifity. Vzhledem k těmto dosaženým výsledkům v rámci optimalizace teplot tání pro stanovení jednotlivých nukleotidů polymorfních pozic (rozdíl v teplotě tání nukleotidů analyzovaných SNP pozic byl vyšší než 1 °C) se domníváme, že zkrácení délky použitých amplifikátů by byla možná cesta k dosažení lepších optimalizačních výsledků.

Jedním z často udávaných parametrů optimalizace analýzy DNA pomocí metody HRM je stanovení senzitivity a specifity (van der Stoep et al., 2009; Křenková et al., 2009). Jelikož z technických důvodů nebylo možné ověřit nukleotidové varianty všech vzorků analyzovaných SNP, za současných podmínek tyto hodnoty nebylo možné stanovit. V budoucnu by však bylo možné dodatečně otestovat všechny vzorky jinou metodou genotypizace, například sekvenací, za následného určení specifity a senzitivity.

Dalším stanovovaným parametrem metody je robustnost metody. V naší studii jsme se zaměřili na testování snížení koncentrace vstupní mtDNA do amplifikační reakce, a to testováním na ředící řadě koncentrace vstupní mtDNA. Podobně jako ve studii Norambuena et al. (2009), ani v naší studii nebyl prokázán vliv nízké koncentrace mtDNA

na teplotu tání amplifikátu vzorku. Vzhledem k typu analyzovaného materiálu je potvrzení necitlivosti metody vůči nízké koncentraci mtDNA důležitým bodem.

9.1. Analyzační program

Pro hodnocení výsledků analýzy metodou HRM bylo užito programů Gene Scanning a Tm calling.

Program Gene Scanning je přímo určený k hodnocení výsledků analýzy HRM a výstupem analýzy mělo být rozdělení vzorků dle průběhu křivky tání do 2 skupin. Teplota tání vzorků se porovnává vůči zadaným standardům variant pozic analyzované pozice SNP v závislosti na manuálně nastavené citlivosti programu.

Jako největší nevýhodou tohoto programu se jeví nemožnost nastavení rozpětí teplot tání amplifikátů pro každou variantu nukleotidu dle popisných charakteristik teplot tání uvedených ke každé optimalizované analýze SNP v kapitole Výsledky (Tabulka č. 4, č. 6 a 8). Vysoká citlivost programu bez možnosti jasného definování teplotní šíře má za následek rozdělení vzorků do více kategorií, než pouze do dvou podle předpokládaných typů nukleotidů každého SNP. V porovnání se studií Norambuena et al. (2009), rozdílná teplota tání mezi jednotlivými nukleotidy námi analyzovaných SNP nepřesahovala 1 °C (v případě naší studie to bylo v rozmezí 0,44 °C až 0,83 °C), což pravděpodobně mělo za následek nemožnost rozdělení dat dle nukleotidové varianty na dané pozici. Porovnáním našich výsledků s výsledky studie Norambuena et al. (2009) se jeví jako nutná podmínka k možnosti rozdělení analyzovaných vzorků do 2 skupin dle nukleotidových variant SNP právě rozdíl jejich průměrných teplot tání alespoň 1 °C. Správného rozdělení vzorků jsme se snažili docílit změnou nastavení citlivosti, přibližně o poloviční hodnotu než je doporučováno (tj. namísto hodnoty 0,3 byla zadávána hodnota mezi 0,15 a 0,2). Výsledkem byla nízká hladina citlivosti, takže vzorky byly rozděleny do dvou až tří skupin, přesto stanovení nukleotidů u vzorků nebylo ideální.

Lépe se vyhodnocovaly vzorky v programu Tm calling, kde byla uváděna přesná hodnota teplota tání amplifikátů každého vzorku, spolu s lepším grafickým znázorněním průběhu teploty tání amplifikátu. Protože je průběh teploty tání zobrazen první zápornou derivací

křivky tání, ve kterém jsou teploty tání vzorků zobrazeny jako píky, je možné podchytit odchylky od standardního průběhu tání, především vznik nespecifických produktů, které mohou mít vliv na teplotu tání. Z výše uvedených důvodů byly pro další statistické zpracování využity data generovaná tímto programem.

9.2. Úspěšnost izolace mtDNA z trichologického materiálu

Vzhledem k předpokládanému nízkému obsahu mtDNA, byla jako součást izolační metody využita možnost zkoncentrovat izolát mtDNA z trichologických vzorků do menšího objemu Elution Buffer než je předepsáno výrobcem izolačního kitu (množství jsme snížili o polovinu doporučeného objemu). Díky tomu jsme měli k dispozici koncentrovanější izolát mtDNA z trichologického materiálu pro testování všech párů primerů (či případné sekvenace).

Kvantifikace nDNA byla stanovena pouze u vzorků izolátů bukalního stěru. Pokusně byla provedena kvantifikace nDNA tří izolátů vlasů v anagenní fázi a tří izolátů vlasů v telogenní fázi. Dle studie Andréasson et al (2006) se nepředpokládal výskyt detekovatelné nDNA, což se též potvrdilo, jelikož tato kvantifikace neprokázala přítomnost nDNA. Další vzorky trichologického materiálu již kvantifikovány nebyly a do amplifikační reakce byl vždy přidán 1 µl vzorku.

Dle studie Andréasson et al (2006) je možné předpokládat vyšší výtěžnost izolace mtDNA z upraveného trichologického materiálu v anagenní fázi a nižší v případě, že je trichologický materiál v telogenní fázi. Výtěžnost izolační metody byla vztažena k množství amplifikačního produktu (odvozeno od výšky píku v RFU) a tomu předpokladu odpovídá. Z celkového množství vzorků trichologického materiálu v anagenní fázi, 36 vzorků, se podařila izolace mtDNA v detekovatelném a analyzovatelném množství u 30ti vzorků, což je 83,3% z celkového množství vzorků. Naproti tomu bylo užito celkem 17 vzorků trichologického materiálu v telogenní fázi, ze kterých se detekovatelné množství mtDNA podařilo vyizolovat z deseti vzorků, což je 58,8%. Výtěžnost u vzorků v telogenní fázi je nižší než jsme původně očekávali, jelikož jsme na základě studie Pfeiffer et al. (1999) předpokládali přibližně 70% výtěžnost.

Pro každou analyzovanou SNP pozici byla stanovena teplotní zóna překryvu, kam svojí teplotou tání spadaly obě nukleotidové varianty vyšetřovaného markeru. U vybraných vzorků spadající svojí teplotou tání do zóny překryvu bylo provedeno ověření SNP pozice pomocí sekvenace. Pokud by teplota tání reálných vzorků spadala do oblasti překryvu, bylo by nutné vždy tento typ analýzy provést, jelikož bez dodatečného ověření není možné jednoznačně stanovit nukleotidovou variantu vyšetřované pozice.

9.3. Diskuse k výsledkům analýzy trichologického materiálu pomocí metody HRM

9.3.1. Primer G3010A

Funkčnost primeru a schopnost genotypovat amplikony dle dané varianty nukleotidu byla testována na 25 vzorcích bukálních stěrů. Po ověření funkčnosti bylo analyzováno celkem 7 trichologických sad v anagenní fázi (výsledky jsou uvedeny v kapitole Přílohy: Tabulky, Tabulka č. 2).

Snížený počet užitých vzorků byl způsoben technickými problémy. Tyto problémy měly za následek i nemožnost provést ověření nukleotidových variant přímou sekvenací. Nižší počet vzorků byl ve statistickém hodnocení zohledněn mimo jiné užitím párového neparametrického Wilcoxonova testu, který umožňuje statisticky zhodnotit malý počet vzorků a nepředpokládá normální rozdělení dat.

9.3.2. Primer C7028T

Ačkoliv párový neparametrický Wilcoxonův test nezamítl H_0 hovořící o shodě teplot tání (nukleotidové variantě pozice C7028T) různého trichologického materiálu v anagenní fázi, rádi bychom poukázali na sadu vzorků od osoby označené vz54 (viz Přílohy: Tabulky, Tabulka č. 4), kdy sekvenací bylo potvrzeno, že se na SNP pozici všech typů vzorků (bukální stěr, vlasy, axilární a pubické ochlupení) nachází nukleotid T. Teploty tání amplifikátů se u jednotlivých biologických materiálů v rámci jedince velmi lišily, jelikož teploty tání amplifikátů bukálního stěru a vlasů ležely blízko mediánu pro nukleotid T.

Naproti tomu, teplota tání amplifikátů axilárního a pubického ochlupení již ležely v teplotním pásmu nukleotidu C. Tyto vzorky byly opakovaně testovány se shodnou teplotou tání, proto byla vyloučena chyba v přípravě reakční směsi či vlivu vnitřního reakčního prostředí reakčního běhu. U těchto odlehklých hodnot teplot tání vzorků se nepodařilo zjistit příčinu zvýšené teploty tání.

Podobný případ nastal u vzorků bukálních stěrů v průběhu optimalizace HRM reakce. Jedná se o dvě odlehlé hodnoty (viz Graf č. 4, Graf č. 5 kapitoly Výsledky), zasahující svou teplotou tání do dolního kvartilu distribuce teplot pro nukleotid C. Protože se ani v těchto případech nepodařilo objasnit příčinu zvýšené teploty tání amplifikátu mající nukleotid T, je tedy nutné při genotypizaci námi užitými primery SNP C7028T počítat s určitou možností vzniku falešně pozitivní genotypizace vzorku, kdy vzorek označený jako alela C může být ve skutečnosti alelou T.

Párový neparametrický Wilcoxonův test porovnávající teploty tání amplifikátů bukálních stěrů a vlasů v telogenní fázi zamítl H_0 . To znamená, že byla zamítnuta hypotéza, že teploty tání (respektive varianty nukleotidů SNP C7028T) vyizolované mtDNA z bukálních stěrů a trichologického materiálu v telogenní fázi se neliší. Toto zamítnutí bylo pravděpodobně způsobeno vysokým rozdílem teplot tání vzorků genotypovaných jakožto C. Vzorky vyizolované z bukálních stěrů vykazovaly teploty tání v oblasti překryvu tání pro nukleotid T a C, popřípadě mediánu teploty tání pro nukleotid C. Amplifikáty příslušných vzorků vlasů v telogenní fázi měly naopak teplotu tání nad maximální teplotou pro nukleotid C (viz Přílohy – Tabulka č. 5).

V průběhu optimalizace primerů byla testována citlivost na množství vstupní mtDNA na teplotu tání amplifikátů (viz Přílohy – Tabulka č. 3). Vliv snížené koncentrace však nebyl pozorován.

Jelikož všechny vzorky trichologického materiálu byly izolovány dle stejného protokolu, nedomníváme se, že by izolační technika měla vliv na teplotu tání amplifikátů. Důvody, proč vzorky vlasů v telogenní fázi alely C měly zvýšenou teplotu tání, se nepodařilo zjistit.

Na základě výše uvedených zjištění se domníváme, že k analýze trichologického materiálu pomocí námi užitých primerů SNP C7028T metoda HRM není vhodná pro trichologický materiál v telogenní fázi, nicméně nezamítnutím H_0 pro porovnání trichologického materiálu v anagenní fázi je možné uvažovat o využití tohoto primeru pro genotypizaci tohoto typu vzorků.

9.4. Zařazení analyzovaných vzorků do haploskupin

Jedním z cílů této práce byla možnost zařazení analyzovaných vzorků do příslušných haploskupin v závislosti na přiřazené nukleotidové variantě jednotlivých SNP (dle studií Brandstätter et al. 2003, Parson et al. 2003, Brandstätter et al. 2005, Köhnemann et al. 2009, Niederstätter et al. 2009). Vzhledem k těsnému vztahu vybraných SNPs a z důvodů popsaných v kapitole Výsledky nemohla být většina kombinací stanoveného genotypu využita pro jednoznačné přiřazení do haploskupin.

Nemožnost zařazení vzorků do haploskupin je zapříčiněna především vyjmutím páru primerů analyzujících SNPs A2706G a C7028T. V případě absence transice u těchto SNPs, spadá vzorek do haploskupiny H. Aby bylo možné stanovit, zda vzorek spadá do subhaploskupiny H1 (stanovení pomocí SNP G3010A, zařazení do H1 je stanoveno výskytem alely A), vzorek zároveň musí spadat do haploskupiny H, což u části vzorků není možné stanovit.

Pomocí SNPs G12372A a C14766T se stanovuje zařazení do haploskupiny U v případě, že na obou pozicích se vyskytuje substituce za mutovanou alelu a současně u daného vzorku díky SNP C7028T nebo A2706G bylo stanoveno, že tento vzorek nespadá pod haploskupinu H (Brandstätter et al. 2003). Díky absenci analýzy pozice G12372A a částečné absenci analýzy pozice C7028T proto není možné vzorky zařadit do haploskupiny U.

Na základě výše uvedených skutečností bude analýza SNP C14766T (analýza trichologického materiálu v anagenní a telogenní fázi) a pozic C7028T, G3010A (analýza

trichologického materiálu v anagenní fázi) využita pouze ke genotypizaci daných pozic, nikoliv k zařazení do příslušných haploskupin

10. ZÁVĚR

Celkem byla optimalizována analýza 3 SNP pozic. K pozicím G3010A, C14766T a C7028T se podařilo úspěšně optimalizovat průběh amplifikační reakce, včetně analýzy nukleotidů SNP v amplifikátu příslušného vzorku. Na základě statistického vyhodnocení pro trichologický materiál v anagenní a telogenní fázi pro SNP C14766T platí, že není signifikantní rozdíl mezi mtDNA vyšetřovaného nukleotidu u různého biologického materiálu jedinců. U primerů analyzujících SNPs G3010A a C7028T nebylo toto tvrzení vyvráceno pouze u trichologického materiálu v anagenní fázi.

Z důvodu úzké provázanosti SNP pozic stanovující haploskupiny a úplného vyloučení analýzy dvou SNP pozic z této studie, analyzované pozice nemohou sloužit ke stanovení haploskupiny, ale pouze ke genotypizaci dané pozice.

Na základě této studie byl připraven protokol k analýze trichologického materiálu metodou HRM pozic G3010A, C7028T, C14766T. Tento protokol je možné užít ve forenzní praxi.

Díky typu dědičnosti mtDNA není možné nahlížet na identifikace vzorků na úrovni jedince, ale lze využít identifikaci trichologického materiálu ve smyslu porovnání vzorků s referenčním vzorkem a následného vyloučení shody. V praxi by se vyloučily vzorky, které se svým genotypem neshodují s profilem referenčního vzorku. Dále by byly analyzovány vzorky vykazující shodu s referenčním materiálem, například by se vzorky sekvenovaly. Liší-li se sekvence mtDNA vzorku získaného z biologické stopy vůči referenčnímu vzorku, je málo pravděpodobné, že vzorky pocházejí od jednoho jedince a je tedy možné vyloučení shody biologických materiálů. Při shodnosti však zároveň není možné potvrdit shodu zdroje biologického materiálu. Proto je nutné na tuto metodu nahlížet jakožto na podpůrnou screeningovou metodu ke stávajícím genotypizačním metodám a brát ji jako zdroj informace pro typ vzorků, které není možné analyzovat a identifikovat metodami současné forenzně-genetické praxe.

11. POUŽITÁ LITERATURA

- Anderson S, Bankier AT, Barrell G, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- Andréasson H, Nilsson M, Budowle B, Lundberg H, Allen M. 2006. Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Science International* 164: 56-64.
- Andrews R, Kubacka I, Chinnery P, Lightowlers R, Turnbull D, Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 23: 147 - 158.
- Anonym 2006. HRM Assay Design and Analysis CorProtocol™ 6000-1-July06. RCorbertt Research.
- Brandstaetter A, Parson JT, Parson W. 2003. Rapid screening of mtDNA coding region SNPs of the identification of west European Caucasian haplogroups. *International Journal of Legal Medicine* 117: 291- 298.
- Brandstaetter A, Salas A, Niederstaetter H, Gassner C, Carracedo A, Parson W. 2006. Dissection of mitochondrial superhaplogroup H using coding region SNPs. *Electrophoresis* 27: 2541-2550.
- Brookes AJ. 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-186.
- Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. 2003. Forensic and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 4: 119-141.
- Danielko DM, Ring BD, Pierce GF. 1996. Growth factors and cytokines in hair follicle development and cycling: recent insights from animal models and the potentials for clinical therapy. *Molecular Medicine Today* 2: 460-467.

- Deedrick DW. 2000. Part 1: Hair Evidence. Forensic Science Communications 2, 3. [Online] [Citováno v únoru 2013] Dostupné na: <<http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2000/deedrick.htm>>.
- Deedrick DW. 2001. Trace evidence - hairs/fibers - crime scene. Forensic Evidence, 49: 1 - 5.
- Edson SM, Ross JP, Coble MD, Parson TJ, Barrett SM. 2004. Naming the dead – confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. Forensic Science Review, 16: 64- 89.
- Finnila S, Lehtonen S, Majamaa K. 2001. Phylogenetic network for European mtDNA. American Journal of Human Genetics 68: 1475-1484.
- Fischer H, Eckhart L, Mildner M, Jaeger K, Buchberger M, Ghannadan M, Tschachler E. 2007. DNase1L2 degrades nuclear DNA during corneocyte formation. Journal of Investigative Dermatology 127: 24-30.
- Gabriel MN, Calloway CD, Reynolds RL, Primonac D. 2003. Identification of human remains by immobilized sequence – specific oligonucleotide probe analysis of mtDNA hypervariable regions I and II. Croatian Medical Journal 44: 293-298.
- Gill P, Ivanov P.L, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K. 1994. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. Nature Genetics 6: 130-135.
- Gilles RE, Blanc H, Cann HM, Wallance DC. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 77: 6715-6719.
- Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. 2003. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed – tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. Clinical Chemistry 49: 396-406.
- Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. Annual Review of Biochemistry 67: 425-479.

- Herrmann MG, Durtschi JD, Wittwer CT, Voelkerding KV. 2007. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clinical Chemistry*, 53: 1544 – 1548
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10: 413-417.
- Holland MM, Parson TJ. 1999. Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework. *Forensic Science Review* 11: 21-50.
- Kaufman KD. 1996. Androgen metabolism as it affects hair growth in androgenetic alopecia. *Dermatologic Clinics* 14: 697-711.
- Koehmann S, Hohoff C, Pfeiffer H. 2009. An economical mtDNA SNP assay detecting different mitochondrial haplogroups in identical HVR 1 samples of Caucasian ancestry. *Mitochondrion* 9: 370- 375.
- Křenková P, Norambuena P, Štambergová A, Macek.MJr. 2009. Evaluation of high-resolution melting (HRM) for mutation scanning of selected exons of the CFTR gene. *Folia Biologica* 55: 238-242
- Lipsky RH, Mazzanti CM, Rudolph JG, Xu K, Vyas G, Bozak D, et al. 2001. DNA melting analysis for detection of single nucleotide polymorphism. *Clinical Chemistry* 47: 635-44.
- Monis PT, Giglio S, Saint CP. 2005. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical Biochemistry* 340: 24-34.
- Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM, Smerick JB, Budowle B. 2001. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *Journal of Forensic Sciences* 46: 647-660.
- Morioka K. 2005. Hair Follicle. Differentiation under the electron microscope. Springer-Verlag Tokyo Berlin Heidelberg New York.

- Norambuena PA, Copeland JA, Křenková P, Štambergová A, Macek MJr. 2009. Diagnostic method validation: high resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. *Clinical Biochemistry* 42: 1308 – 1316.
- Obana N, Chang C, Uno H. 1997. Inhibition of hair growth by testosterone in the presence of dermal papilla cells from the frontal bald scalp of the postpubertal stump-tailed macaque. *Endocrinology* 138: 356-61.
- Panteleyev AA, Jahoda CA, Christiano AM. 2001. Hair follicle predetermination. *Journal of Cell Science* 114: 3419-3431.
- Paulus R, Cotsarelis G. 1999. The Biology of Hair Follicles. *The New England Journal of Medicine* 341: 491-7.
- Petraco N. 1985. The occurrence of trace evidence in one examiner's casework. *Journal of Forensic Sciences* 30, 2: 485-493.
- Pfeiffer H, Hühne J, Ortmann C, Waterkamp K, Brinkmann B. 1999. Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts – success rates and sequence comparisons. *International Journal of Legal Medicine* 112: 287 – 290.
- Pinz KG, Bogenhagen DF. 1998. Efficient repair of basic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Molecular et Cellular Biolology* 18: 1257-1265.
- Říhová V. 1951. Vady a choroby vlasů (trichologie). Zdravotnické nakladatelství.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245: 154-160.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencig with chain – terminating inhibitors. *Biochemistry, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74: 5463 – 5467.
- Satoh M, Kuroiwa T. 1991. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Experimental Cell Research* 196, 1: 137-140.

- Scheffler IE. 1999. Mitochondria. Wiley, New York.
- Simons AF, Cummins JM. 1996. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 93: 13859-13863.
- Slominski A, Paus R, Plonka P, Chakraborty A, Maurer M, Pruski D, Lukiewicz S. 1994. Melanogenesis during the anagen-catagen-telogen transformation of the murine hair cycle. *The Journal of Investigative Dermatology* 102: 862-9.
- van der Stoep N, Paridon CDM, Janssen T, Krenkova P, Stambergova A, Macek M, Matthijs G, Bakker E. 2009. Diagnostic guidelines for high-resolution melting curve analysis: an interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96-well LightScannerTM. *Human Mutation* 30: 899-909.
- Stoneking M. 1994. Mitochondrial DNA and human evolution. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26: 251-259.
- Strauss E. 1999. Can Mitochondrial Clocks Keep Time? *Science* 283: 1435-1438.
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. 2000. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102: 451-461.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith OH, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wotman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH et al. 2001. The sequence of the human genome, *Science* 291: 1304 – 1351.
- Wallace CD, Brown DM, Lott MT. 1999. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238: 211-230.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR – based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-13.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22: 130-138.

Wittwer CT, Reed GG, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry* 49: 853-860.

Zvára K. 2008. *Biostatistika*. Karolinum.

12. PŘÍLOHY

12.1. Tabulky

Tabulka č. 1. Přehled výsledků teplot tání pro amplifikáty primeru G3010A.

testování ředění vzorků - primer G3010A			
	Tm 1	Tm 2	Tm 3
ředění			
50x	81,3	81,26	81,32
100x	81,19	81,15	81,29
500x	81,16	81,13	81,17
1000x	81,25	81,25	81,3
5000x	81,26	81,19	81,19
10000x	81,24	81,2	80,85
20000x	81,27	81,2	NA
50000x	81,2	NA	NA

Testování teplot tání rozředěného zásobního roztoku o koncentraci nDNA 1ng / 1μl, ředění uvedeno v tabulce.

Tabulka č. 2. Přehled výsledků průměrných teplot tání amplifikátů analyzovaných primery G3010A.

	primer G3010A				
č. vzorku	Tm buk	Tm vl	Tm ax	Tm pub	nukleotid
vz 19	80,67	80,73	80,76	80,68	A
vz 30	81,14	81,83	81,26	81,22	G
vz 45	81,17	81,26	81,43	81,20	G
vz 53	81,52	81,63	81,28	81,29	G
vz 54	81,35	81,35	NA	81,92	G
vz 55	80,81	80,92	80,69	NA	A
vz 67	80,79	80,77	80,71	80,75	A

Užitý trichologický materiál byl v anagenní fázi. Tm buk – teplota tání izolátu bukálního stěru, Tm vl – teplota tání izolátu vlasů, Tm ax – teplota tání izolátu axilárního ochlupení, Tm pub – teplota tání izolátu pubického ochlupení. Ve sloupci nukleotid je uvedena nukleotidová varianta na dané SNP pozici.

Tabulka č.3. Přehled výsledků teplot tání pro amplifikáty primeru C7028T.

testování ředění vzorků - primer C7028T			
	Tm 1	Tm 2	Tm 3
ředění			
50x	79,81	79,68	79,84
100x	79,74	79,75	79,81
500x	79,78	79,77	79,75
1000x	79,67	79,77	79,68
5000x	79,79	79,79	79,79
10000x	79,52	79,46	79,47
20000x	79,54	79,53	79,54
50000x	79,55	79,64	79,55

Testování teploty tání rozředěného zásobního roztoku o koncentraci nDNA 1ng / 1 μ l, ředění uvedeno v tabulce.

Tabulka č. 4. Přehled výsledků průměrných teplot tání amplifikátů analyzovaných primery C7028T.

	primer C7028T				
č. vzorku	Tm buk	Tm vl	Tm ax	Tm pub	nukleotid
vz 19	79,67	79,58	79,42	79,50	T
vz 30	80,05	80,37	80,05	80,09	C
vz 45	80,43	80,31	80,34	80,22	C
vz 53	80,00	80,24	80,08	80,04	C
vz 54	79,61	79,66	80,40	80,10	T
vz 55	79,86	79,96	79,60	80,55	C
vz 60	80,34	80,37	80,57	80,28	C
vz 66	80,12	80,22	80,13	80,03	C
vz 67	80,02	80,05	80,04	80,03	C
vz 71	79,70	79,46	79,47	79,69	T

Užitý trichologický materiál byl v anagenní fázi. Tm buk – teplota tání izolátu bukálního stěru, Tm vl – teplota tání izolátu vlasů, Tm ax – teplota tání izolátu axilárního ochlupení, Tm pub – teplota tání izolátu pubického ochlupení. Ve sloupci nukleotid je uvedena nukleotidová varianta na dané SNP pozici.

Tabulka č. 5. Přehled výsledků průměrných teplot tání amplifikátů analyzovaných primery C7028T.

primer C7028T			
č. vzorku	Tm buk	Tm vl	nukleotid
PA 1	80,05	80,37	C
PA 6	79,61	80,34	T
PA 7	79,99	80,58	C
PA 11	79,74	79,90	T
PA 13	79,96	80,40	C
PA 15	80,11	80,43	C
PA 16	80,20	80,68	C
PA 17	80,24	80,29	C
PA 19	79,89	80,28	C
PA 21	80,37	80,27	C

Vzorky vlasů jsou v telogenní fázi. Tm buk – teplota tání izolátu bukálního stěru, Tm vl – teplota tání izolátu vlasů. Ve sloupci nukleotid je uvedena nukleotidová varianta na dané SNP pozici.

Tabulka č.6. Přehled výsledků teplot tání pro amplifikáty primeru C14766T

testování ředění vzorků - primer C14766T			
	Tm 1	Tm 2	Tm 3
ředění			
50x	75,71	75,74	75,71
100x	75,51	75,46	75,37
500x	75,74	75,36	75,46
1000x	75,76	75,94	75,62
5000x	75,5	75,47	75,51
10000x	75,83	75,83	75,74
20000x	75,8	75,31	NA
50000x	75,6	75,63	74,78

Testování teploty tání rozředěného zásobního roztoku o koncentraci nDNA 1ng / 1μl, ředění uvedeno v tabulce

Tabulka č. 7. Přehled výsledků průměrných teplot tání amplifikátů analyzovaných primery C14766T.

primer C14766T					
č. vzorku	Tm buk	Tm vl	Tm ax	Tm pub	nukleotid
vz 19	75,58	75,46	75,56	75,74	T
vz 30	76,55	77,98	76,28	76,54	C
vz 45	76,32	76,55	76,64	76,41	C
vz 53	76,65	76,79	76,16	76,39	C
vz 54	75,66	75,72	NA	75,77	T
vz 55	75,50	75,67	74,83	74,94	T
vz 60	76,19	76,28	76,54	76,27	C
vz 66	76,74	76,46	76,53	76,29	C
vz 67	76,12	76,09	76,20	76,48	C
vz 71	75,33	75,75	75,66	75,87	T

Užitý trichologický materiál byl v anagenní fázi. Tm buk – teplota tání izolátu bukálního stěru, Tm vl – teplota tání izolátu vlasů, Tm ax – teplota tání izolátu axilárního ochlupení, Tm pub – teplota tání izolátu pubického ochlupení. Ve sloupci nukleotid je uvedena nukleotidová varianta na dané SNP pozici.

Tabulka č. 8. Přehled výsledků průměrných teplot tání amplifikátů analyzovaných primery C14766T.

primer C14766T			
č. vzorku	Tm buk	Tm vl	nukleotid
PA 1	76,17	76,00	C
PA 6	75,53	75,86	T
PA 7	76,20	76,25	C
PA 11	75,47	75,85	T
PA 13	75,86	75,88	T
PA 15	75,48	75,29	T
PA 16	75,84	75,63	T
PA 17	76,35	76,09	C
PA 19	75,79	75,68	T
PA 21	75,40	75,30	T

Vzorky vlasů jsou v telogenní fázi. Tm buk – teplota tání izolátu bukálního stěru, Tm vl – teplota tání izolátu vlasů. Ve sloupci nukleotid je uvedena nukleotidová varianta na dané SNP pozici.

12.2. Seznam použitých chemikálií

V textu	Název (výrobce)
dH ₂ O	DNA, RNA Nucleasa – free Water (Eppendorf AG)
DNA IQ	DNA IQ™ (Promega)
DNA Remover	DNA – Remover™ (Minerva Biolabs)
ExoSAP-IT	ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-Up (Affymetrix)
HRM Master Mix	LightCycler® 480 High Resolution Melting Master
Chelex 100	Chelex® 100 Resin (Bio – Rad Laboratories)
Incidur Spray	Incidur® Spray (Ecolab)
Inkubační pufr	Incubation buffer, součást Tissue and Hair Extraction Kit (Promega)
Izolační sada Tissue and Hair Extraction Kit	Tissue and Hair Extraction Kit (Promega)
Kit BigDye Xterminator	BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems)
Lyzační pufr	Lysin buffer, součást DNA IQ™ (Promega)
PK	Proteináza K (Sigma – Aldrich Co.)
Promývací pufr	Wash buffer, součást DNA IQ™ (Promega)
SYBR Green I Master Mix	LightCycler® 480 SYBR Green I Master

Quantifiler Human	Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems)
Uvolňovací pufr	Elution buffer, součást DNA IQ™ (Promega)

12.3. Seznam použitých přístrojů

V textu	Název (výrobce)
1,5 ml zkumavka	zkumavka 1,5 ml (Eppendorf AG)
96 jamková destička	MicroAmp [®] optical 96well reaction plate with barcode (App. Bio.)
Centrifuga	Centrifuge 5415D (Eppendorf AG)
Kapilára sekvenátoru	36 cm kapilára s polymerem POP-4 [™]
LightCycler	LightCycler [®] 480 II (Roche)
Mikroskop	Olympus BX50 F-3
Rotační třepačka	HIM20 (Grant Boekel)
Sekvenátor	ABI PRISM [®] 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
tampon Dispolab	Dispolab (Copan Italia)
Termocycler ABI9700	GeneAmp [®] PCR Systém 9700 (Applied Biosystems)
Thermocyler Verity	Veriti [™] 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)
Velká centrifuga	Centrifuge 5810 (Eppendorf AG)
Vortex	IKA [®] Vortex Genius 3 (Vitrrium [®])
Vyhřívaná třepačka	Themomixer Comfort 1,5 ml (Eppendorf AG)